

Etablierung und Charakterisierung von Gliomzelllinien

Elke Kutter

Disbui. München

1989

Aus dem Institut für Tierpathologie der
Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Etablierung und Charakterisierung von Gliomzelllinien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Elke Kutter
aus Memmingen

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Dr.habil. J. Bauer

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. LEBENSZYKLUSSTUDIEN	2
1. In vitro-Echtung von Mäusen	2
2. In vivo-Echtung von Mäusen	2
3. Ansporenexpression von Mäusen aus	10
3.1. Eigenschaften der Infektion	10
3.1.1. 1-100 Sporen	10
3.1.2. Sporen M. flavus subsp. (SFA)	10
3.2. M. flavus subsp. SFA	10
C. BEWERTUNG	10
D. EINIGE BEWERTUNGSFÄHIGKEITEN	10
1. Material August und Margarete	10
1.1. Eigenschaften	10
1.2. Eigenschaften	10
1.2.1. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.2. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.3. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.4. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.5. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.6. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.7. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.8. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.9. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.10. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.11. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.12. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.13. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.14. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.15. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.16. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.17. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.18. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.19. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.20. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.21. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.22. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.23. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.24. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.25. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.26. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.27. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.28. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.29. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.30. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.31. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.32. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.33. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.34. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.35. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.36. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.37. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.38. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.39. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.40. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.41. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.42. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.43. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.44. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.45. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.46. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.47. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.48. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.49. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.50. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.51. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.52. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.53. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.54. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.55. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.56. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.57. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.58. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.59. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.60. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.61. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.62. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.63. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.64. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.65. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.66. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.67. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.68. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.69. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.70. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.71. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.72. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.73. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.74. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.75. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.76. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.77. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.78. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.79. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.80. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.81. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.82. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.83. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.84. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.85. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.86. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.87. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.88. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.89. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.90. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.91. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.92. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.93. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.94. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.95. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.96. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.97. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.98. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.99. Eigenschaften der Infektion	10
1.2.100. Eigenschaften der Infektion	10

THEORY OF THE EARTH AND ITS HISTORY
BY HENRY DE LA BECHE

THEORY OF THE EARTH AND ITS HISTORY
BY HENRY DE LA BECHE

THEORY OF THE EARTH AND ITS HISTORY
BY HENRY DE LA BECHE

THEORY OF THE EARTH AND ITS HISTORY
BY HENRY DE LA BECHE

THEORY OF THE EARTH AND ITS HISTORY
BY HENRY DE LA BECHE

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
A. EINLEITUNG	4
B. LITERATURÜBERSICHT	6
1. In vitro-Züchtung von Gliomen	6
2. In vivo-Züchtung von Gliomen	8
3. Antigenexpression von Hirntumoren	12
3.1. Gliaassoziierte Antigene	12
3.1.1. S-100 Protein	12
3.1.2. Saures Gliafaserprotein (GFAP)	14
3.2. Gliomassoziierte Antigene	16
C. PROBLEMSTELLUNG	19
D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	21
1. Material und Methoden	21
1.1. Versuchstiere	21
1.2. Tumormaterial	21
1.2.1. Histologische Untersuchung	22
1.2.2. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung	22
1.3. Zellmaterial	23
1.3.1. Tumorzellkulturen	23
1.3.2. Subkulturen	24
1.3.3. Konservierung und Lagerung von Zellen	24
1.3.4. Generationszeit	25
1.3.5. "Plating efficiency"	25
1.3.6. Klonierung	26
1.3.7. Behandlung von Gliomzellen mit db-cAMP	27
1.3.8. Chromosomendarstellung	27

1.4. Transplantation von Tumoren	30
1.4.1. Subkutane Transplantation	30
1.4.2. Intracerebrale Transplantation	30
1.4.3. In vitro Etablierung von Zell- linien aus Transplantations- tumoren	31
1.5. Nachweis gliassoziierter Antigene	31
1.5.1. Indirekte Immunperoxidasefärbung	31
1.5.2. Immunfluoreszenz	33
1.6. Nachweis gliomassoziierter Antigene	33
1.6.1. Indirekte Immunperoxidasefärbung	33
1.6.2. Immunfluoreszenz	34
2. Ergebnisse	35
2.1. Lichtmikroskopie	35
2.1.1. Tumoren	35
2.1.2. Zellkulturen	37
2.2. Rasterelektronenmikroskopie	39
2.3. Effekt von db-cAMP auf Gliomzellen	39
2.3.1. Lichtmikroskopie	39
2.3.2. Rasterelektronenmikroskopie	40
2.4. Tumorigenität	40
2.5. "Plating efficiency" und Generations- zeit	41
2.6. Chromosomenanalyse	47
2.7. Immunologische Untersuchungen	50
2.7.1. Expression gliassoziierter Antigene	50
2.7.1.1. Tumoren	50
2.7.1.2. Zellkulturen	51
2.7.2. Expression gliomassoziierter Antigene	52
2.7.2.1. Tumoren	53
2.7.2.2. Zellkulturen	53

E. DISKUSSION	56
---------------	----

F. ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY	64
------------------------------	----

G. LITERATURVERZEICHNIS	68
-------------------------	----

A. EINLEITUNG

Die Ursprünge der in vitro Gewebekultivation liegen in embryologischen Untersuchungen, die im letzten Jahrhundert durchgeführt wurden. ROUX (1885) gelang es die Medullarscheibe eines Hühnerembryos einige Tage in warmer Salzlösung zu bewahren. Dies ging als erster erfolgreicher Fall einer Gewebsexplantation in die Literatur ein (PAUL, 1980).

Als eigentlicher Beginn der Gewebekulturtechnik wird das Jahr 1907 angesehen, als HARRISON Nervengewebe von Froschembryonen auf Gerinnsel aus Froschlymphe explantierte und das Auswachsen von Nervenfasern aus diesen Explantaten beobachten konnte. Viele weitere Versuche wurden in der Folgezeit durchgeführt, jedoch erst mit der Einführung der Trypsinierungstechnik (MOSCONA, 1952), deren erste Erwähnung im Jahre 1916 (ROUS und JONES) keine große Beachtung fand, wurde der Übergang von der Gewebe- zur Zellkultivation eingeleitet (PAUL, 1980).

Unter den primären Tumoren des Zentralnervensystems bei Erwachsenen sind maligne Gliome häufig anzutreffen (BULLARD und BIGNER, 1985). Trotz Ausschöpfung aller therapeutischer Möglichkeiten, wie Resektion gefolgt von Bestrahlung und Chemotherapie, ist die Überlebensspanne der Patienten sehr gering. Auf Grund der operationstechnisch bedingten schweren Zugänglichkeit dieser Tumoren ist die Menge an Biopsiematerial häufig sehr gering. Für zellbiologische Untersuchungen steht deshalb oft nur beschränkt Material zur Verfügung. Zusätzlich erscheint die Repräsentativität des gewonnenen Ge-

websstückchens für den Gesamttumor auf Grund der Heterogenität der Zellpopulation nicht gesichert. Andererseits sind Zellkulturen ein wichtiges Hilfsmittel, vor allem formalpathogenetische, diagnostische und therapeutische Fragestellungen zu untersuchen. Eine große Bedeutung liegt dabei in der Tatsache, daß durch die Standardisierung der Kulturbedingungen Vergleiche zwischen verschiedenen Passagen der gleichen Kultur und auch zwischen Zellkulturen unterschiedlicher Herkunft angestellt werden können. Die leichte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse stellt dabei einen weiteren großen Vorteil dar.

B. LITERATURÜBERSICHT

1. In vitro-Züchtung von Gliomen

Die Lebensfähigkeit maligner Gliome in vitro wurde erstmals 1925 von FISCHER beschrieben. Ihm gelang es, Zellen eines malignen Glioms für 2 Monate in der Kultur zu halten.

In der Folgezeit bestätigten weitere Autoren die Fähigkeit zentralnervalen Gewebes, in vitro zu wachsen (KREDEL, 1928; BUCKLEY, 1929; RUSSELL und BLAND, 1933). Die bis dahin erschienenen Arbeiten beschäftigten sich vorwiegend mit den sogenannten Kurzzeitkulturen, bis KERSTING (1961) eine systematische Kultivierung von menschlichen Hirngeschwülsten über einen längeren Zeitraum gelang. Er explantierte zerkleinerte Tumorstückchen auf Deckgläser und hatte in 90 % der Fälle Erfolg.

Diese Technik zur Beobachtung des morphologischen Verhaltens intrakranialer Tumoren in vitro wurde auch von anderen Autoren angewendet (MANUELIDIS und POND, 1959; LUMSDEN, 1971). Nach der gleichen Methode versuchte MANUELIDIS (1965) 77 Glioblastome zu kultivieren. Bei 13 Explantaten konnte kein Wachstum festgestellt werden, weitere 35 Kulturen stellten nach einer durchschnittlichen Überlebensdauer von 263 (16 bis 1264) Tagen ihr Wachstum ein. Von den verbleibenden 29 Zelllinien befand sich die älteste seit 2839 Tagen in Kultur.

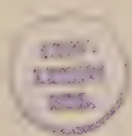
In den Veröffentlichungen von PONTEN und MACINTYRE (1968), WESTERMARK et al. (1973), PONTEN und WESTERMARK (1978) wurden die Wachstumseigenschaften und die

Morphologie nicht-neoplastischer Gliazellen mit denen maligner Gliome in vitro verglichen.

Die Fähigkeit maligner Gliome, sich in vitro als permanente Zelllinien zu etablieren, ist an das Vorhandensein von Zellen einer bestimmten Differenzierungsstufe gebunden. Diese Zellen müssen neben initialem Wachstum auch nach wiederholter Subkultivierung durch Trypsinierung überlebensfähig sein. Unter den Astrozytomen sind sie nur in Grad III und IV vorhanden, nicht jedoch in Astrozytomen Grad I und II. Sowohl in vivo als auch in vitro zeichnen diese Zellen sich durch ein pleomorphes Erscheinungsbild aus, wobei in vitro eine bipolare Zellart, ähnlich einem primitiven Neuroblasten, vorherrschend ist (WESTERMARK et al., 1973).

Für eine erfolgreiche in vitro Etablierung ist eine Verdoppelung des diploiden Chromosomensatzes notwendig (BIGNER und MARK, 1984; BIGNER et al., 1987). Diese Chromosomenverdoppelung findet zwischen der 12. bis 30. in vitro Passage statt, während Gliome des Menschen, die durch einen konstanten diploiden Chromosomensatz mit geringen Abweichungen im gonosomalen Bereich gekennzeichnet sind, ihr Wachstum nach der 12. bis 16. Passage einstellen (RANKIN et al., 1980; BIGNER et al., 1984).

DUFFY (1983) berichtet bei Explantaten von Astrozytomen Grad I und II über eine Entwicklung der Zellen von bipolar über flach, polygonal zu ausdifferenzierten, sternförmigen Stadien. Im Gegensatz dazu weisen Explantate maligner Astrozytome eine von Beginn an größere Variation in der Zellgestalt (spindelförmig, polygonal, flach) sowie eine erhöhte Mitoserate und abweichende Bewegungsmuster der Einzelzelle auf. Auch bei Zellkulturen aus malignen Astrozytomen können sternför-



mige Zellen vorkommen, diese sind jedoch meistens unregelmäßig geformt, können aber zum Teil von normalen Astrozyten nicht unterschieden werden (LISS, 1972).

Durch exogen zugeführtes cyclisches Adenosin-3'5'-Monophosphat (cAMP) und seiner Derivate können Änderungen in der Morphe verschiedener glialer Zelllinien bewirkt werden. Diese Änderungen bestehen in einem Wechsel von undifferenzierten zu differenzierten morphologischen Charakteristika gutartiger und normaler Zellen (FURMAN und SHULMAN, 1977; JOHNSON und PASTAN, 1972).

Verschiedene Veränderungen werden von N_6O_2 -Dibutyryl cAMP ausgelöst. Dazu gehören eine Verlangsamung des Wachstums, verbunden mit einer Reduktion der Endzellichte und eine Modifikation der zellulären Struktur (MACINTYRE et al., 1972; ANZIL et al., 1979).

Bis heute wurde eine Vielzahl intrakranialer Tumoren mit Hilfe der Trypsinierungstechnik kultiviert und nach den verschiedensten Gesichtspunkten charakterisiert. So gelang es MANOURY (1977), aus 50 Primärtumoren 5 permanente Zelllinien zu etablieren, davon 4 maligne Gliome und 1 meningeales Sarkom.

2. In vivo-Züchtung von Gliomen

Die ersten Versuche, humane Hirntumoren in Labortiere zu transplantieren, wurden von GREENE und ARNOLD (1945) durchgeführt. Über eine erfolgreiche intracerebrale Transplantation von Gliomen und Meningeomen des Menschen in immunkompetente Ratten und Mäuse berichtete GREEN (1951, 1953).

Die Anstrengungen, Tumoren des Menschen in Tiere zu transplantieren, erreichten jedoch erst durch die Verwendung immundefizienter Tiere größere Popularität. So wurden verschiedene humane Tumoren, jedoch keine Hirntumoren, in neugeborene, thymektomierte Hamster subcutan transplantiert (COBB, 1974).

Ähnliche Versuche wurden mit thymektomierten und zusätzlich bestrahlten Mäusen durchgeführt (FRANKS et al., 1975, 1976).

Im immunkompetenten Organismus sind es vorwiegend die thymusabhängigen Anteile des Immunsystems, die zu Transplantatabstoßungen führen (FORTMEYER, 1981). Von großer Bedeutung war deshalb die Entdeckung des morphologischen und funktionellen Thymusdefektes einer von FLANAGAN (1966) als "nude" bezeichneten haarlosen Mausmutante (PANTELOURIS, 1968).

Die ersten Untersuchungen zeigten, daß auf Nacktmäuse transplantierte Rattenhaut von diesen auf Dauer akzeptiert und nicht abgestoßen wurde (RYGAARD, 1969). Im gleichen Jahr gelang RYGAARD und POVLSEN die subcutane serienmäßige Transplantation eines Adenokarzinoms des Colons in die Nacktmaus.

Dieser Erfolg ließ darauf hoffen, ein geeignetes Modell für Studien in bezug auf die Tumorigenität von Zelllinien und Beurteilung von therapeutischen Mitteln gefunden zu haben, ohne auf Maßnahmen wie Thymektomie oder immunsuppressive Behandlungen, die oft eine eingeschränkte Wirkung bzw. unerwünschte Nebeneffekte zur Folge haben, zurückgreifen zu müssen.

Die homozygote Nacktmaus, für die das Symbol "nu/nu" eingeführt wurde (FLANAGAN, 1966), weist wie der heterozygote Anlageträger (nu/+) stark verminderte Leukozyten bzw. Lymphozytenzahlen im peripheren Blut

auf (PANTELOURIS, 1968). Die auf "nu/nu" beschränkte ausgeprägte Immundefizienz ist jedoch nicht so sehr auf eine geringe Anzahl von Abwehrzellen, als vielmehr auf das Fehlen ganz bestimmter funktioneller Zellgruppen zurückzuführen (FORTMEYER, 1981). So weist die nu/nu-Maus keine funktionellen T-Zellen auf, was trotz des Vorhandenseins sogenannter "T-cell progenitors" ("pre-thymic cells", "pre-T-cells") darauf zurückzuführen ist, daß es auf Grund der Thymusaplasie nicht zur abschließenden Prägung der T-Lymphozyten kommt (LOOR und ROELANTS, 1974, 1975; SATO et al., 1976; FORTMEYER, 1981). Die Anzahl an "natural killer cells (NK)", die als identisch mit den "prethymic cells" anzusehen sind (HOLDEN et al., 1978), unterliegt neben genetischen Einflüssen auch verschiedenen Umweltfaktoren und ist in starkem Maße abhängig vom Alter (HERBERMAN et al., 1975; HERBERMAN, 1978).

Um das biologische und morphologische Verhalten von Hirntumoren studieren zu können, wurden verschiedene Tiertumormodelle entwickelt. Durch Langzeitverabreichung von N-Methyl-N-nitrosoharnstoff (MNH) aus der Stoffgruppe der Nitrosamide, konnten mit überraschender Regelmäßigkeit maligne Tumoren im Nervensystem erzeugt werden (DRUCKREY et al., 1964).

Von verschiedenen Autoren wurde über die Erzeugung solcher experimenteller NS-Tumoren und ihre Beurteilung nach verschiedenen Gesichtspunkten berichtet (THOMAS und KERSTING, 1964; STAVROU, 1970, 1971; STAVROU und HAGLID, 1973).

Gegenüber der Transplantation humanen Tumorgewebes in Nacktmäuse, weisen andere Tiertumormodelle jedoch er-

hebliche Nachteile auf. Es bestehen morphologische oder biologische Unterschiede zu spontanen Hirntumoren des Menschen (BULLARD et al., 1981).

Die Vergleichbarkeit von in Nacktmäuse transplantierten Tumoren mit dem Ausgangsmaterial wurde auf verschiedenen Wegen dargelegt. So setzte ein schleimproduzierendes Colonkarzinom diese Schleimproduktion in der Maus fort (RYGAARD und POVLSEN, 1969), ebenso wie hormonproduzierende Tumoren diese Hormone in der Maus weiterproduzierten, z. B. Antidiuretisches Hormon, Erythropoetin u.a. (KAMEYA et al., 1976).

Auch das histologische Erscheinungsbild der transplantierten Tumoren stimmte weitgehend mit dem des Ursprungstumors überein (RANA et al., 1977; BRADLEY et al., 1978; SHAPIRO et al., 1979; BULLARD et al., 1981; JONES et al., 1981).

Der Beweis, daß es sich bei dem Tumorgewebe auch nach serienmäßiger Transplantation in die Nacktmaus noch um humanes Gewebe handelte, wurde durch Chromosomenanalysen erbracht. Auch nach wiederholten Tierpassagen handelte es sich um einen Karyotyp des Menschen (VISFELDT et al., 1972; POVLSEN et al., 1973, 1975; GIOVANELLA und STEHLIN, 1974; GRANT et al., 1979; DAVIES et al., 1981; BIGNER und MARK, 1984).

Seit es zusätzlich gelungen ist, die Lebensspanne der Nacktmäuse durch entsprechende Änderungen der Umweltbedingungen entscheidend zu verlängern (GIOVANELLA und STEHLIN, 1974), kann wohl kein Zweifel an der Nützlichkeit dieses Tumormodells für das Studium wachstumskinetischer und immunologischer Aspekte sowie der Wirkung antineoplastischer Medikamente mehr bestehen (BRADLEY et al., 1978; HERLYN et al., 1980).

3. Antigenexpression von Hirntumoren

3.1. Gliaassoziierte Antigene

3.1.1. S-100 Protein

Im Zuge der Erforschung spezifischer Proteine des Nervensystems wurde einem bei elektrophoretischen Untersuchungen von MOORE und MCGREGOR (1965) entdeckten sauren Protein große Aufmerksamkeit entgegengebracht. Dieses Ca^{++} -bindende Protein ist in einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung bei pH 7 gut löslich und wurde deshalb S-100 Protein genannt (MOORE, 1965).

Weitere Untersuchungen führten zu der Erkenntnis, daß das S-100 Protein aus 2 Untereinheiten besteht, der a-Untereinheit mit 93 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 10,4 kDa und der b-Untereinheit mit 91 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 10,5 kDa (MOORE, 1982). Durch die Zusammensetzung dieser Untereinheiten ergeben sich 3 Arten von S-100: S-100a (a,b), S-100b (b,b) und S-100ao (a,a).

Die höchsten Konzentrationen an S-100 wurden in Gliazellen gefunden (PEREZ et al., 1970; CICERO et al., 1970), aber auch in neuronalen Strukturen wurde das Protein lokalisiert (HYDÉN und MCEWEN, 1966; PEREZ und MOORE, 1968). Andere Studien beschreiben den Nachweis von S-100 in Schwann'schen Zellen (STAVROU et al., 1973).

Alle diese Autoren gehen davon aus, daß dieses Protein, und vor allem die Fraktion S-100b, vorwiegend in glialen Elementen des Nervensystems vorhanden ist.

In immunologischen Studien von Biopsieproben humaner Hirntumoren konnte das Protein in Glioblastomen, Astrozytomen, Spongioblastomen, Akustikusneurinomen und in einem Teil polymorpher Oligodendrogliome und Ependymome nachgewiesen werden (BENDA, 1968; HAGLID und CARLSSON, 1971; PFEIFFER et al., 1972; HAGLID et al., 1973a, 1973b). Sein vereinzelt Auftreten in Meningeomen wurde mit einer Verunreinigung durch normales Hirngewebe erklärt (HAGLID et al., 1973b).

Zur Beurteilung der Eignung experimenteller Tumoren des Nervensystems für vergleichende Studien wurde, da anhand des Nachweises von S-100 eine Gliazelle von einer mesenchymalen Zelle unterschieden werden kann, deren Histogenese untersucht (STAVROU et al., 1971, 1973).

Ein Zusammenhang zwischen der postoperativen Überlebensspanne von Patienten mit Hirntumoren und dem Gehalt an S-100 in Biopsieproben wurde von HAGLID et al. (1973b) festgestellt. Je niedriger der S-100 Spiegel, desto kürzer war auch die postoperative Überlebenszeit. Dies wurde von anderen Autoren, wenn auch nicht in gleichem Maße bestätigt (DOHAN et al., 1977).

Die Bedeutung von S-100 als ein Gradmesser für die Malignität von Hirntumoren wurde von mehreren Autoren untersucht. HAGLID et al. (1973a, 1973b) fanden die Expression von S-100 in hochdifferenzierten Astrozytomen, quantitativ vergleichbar mit der normaler weißer Hirnsubstanz. Mit dem Grad der Entdifferenzierung der Zellen sank der Gehalt an S-100 Protein. Dieses Ergebnis wurde von DITTMANN et al. (1977) bestätigt, während JACQUE et al. (1979) die gleiche Menge dieses Proteins in Astrozytomen und Glioblastomen fanden und damit eine Beziehung zwischen S-100 Protein

und Differenzierungsgrad von Astrozytomen in Frage stellten.

3.1.2. Saures Gliafaserprotein (GFAP)

Ein bei Analysen alter Multiple Sklerose-Plaques isoliertes Protein, das anfangs "Plaque-Protein" genannt wurde (ENG et al., 1971), erhielt, nachdem es als Bestandteil der Gliafilamente erkannt war, den Namen "saures Gliafaserprotein" (ENG, 1982).

Immunhistologische Untersuchungen zeigten, daß sowohl in normalem Hirngewebe als auch in Hirntumoren GFAP nachgewiesen werden konnte (DITTMANN et al., 1977; DELPECH et al., 1978; GOLDMAN et al., 1978) und deuteten auf die Spezifität dieses Proteins für Astrozyten hin (BIGNAMI und DAHL, 1977; DUFFY et al., 1977).

Die meisten Zellen von Wirbeltieren enthalten ein Stützgerüst in Form eines Cytoskelettes. Ein Bestandteil dieses Cytoskelettes sind die Intermediärfilamente, die ihren Namen erhalten haben, weil sie auf Grund ihrer Stärke von 7 - 11 nm zwischen den Mikrofilamenten (5 - 7 nm) und den Mikrotubuli (22 - 25 nm) eingeordnet werden können. Im Elektronenmikroskop können Intermediärfilamente von anderen Elementen des Cytoskelettes unterschieden werden. Aus den verschiedenen Proteinuntereinheiten ergibt sich eine Unterteilung der Intermediärfilamente in 5 verschiedene Gruppen (BONNIN und RUBINSTEIN, 1984).

1. Cytokeratin, charakteristisch für epitheliale Zellen.
2. Neurofilamente, in den meisten Neuronen enthalten.

3. GFAP, kommt vor allem in Astrozyten vor.
4. Desmin, wird in Skelett-, Herzmuskelzellen und in Zellen der glatten Muskulatur nachgewiesen.
5. Vimentin, charakteristisch für Zellen mesenchymalen Ursprungs, aber auch in anderen Zellen früher Differenzierungsstadien enthalten (z. B. astrozytäre und epitheliale Zellen).

Obwohl die meisten Zellen nur ein spezifisches Intermediärfilament enthalten, gibt es Beispiele für das gleichzeitige Vorkommen zweier verschiedener Intermediärfilamente innerhalb einer Zelle. In solchen Fällen ist der eine Teil immer Vimentin. Die Koexistenz von Vimentin und GFAP in glialen Zellen wurde wiederholt beschrieben. Innerhalb dieser Polypeptide stimmen 30 - 80 % der Aminosäuresequenzen überein. Trotzdem lassen sich keine signifikanten Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Antiseren feststellen (BONNIN und RUBINSTEIN, 1984).

Ein hoher Gehalt an GFAP fand sich in fibrillären Astrozyten, während protoplasmatische Astrozyten, die nur wenige Filamente enthalten, nur in geringem Maße positiv reagierten (DUFFY, 1983).

In der Tumordiagnostik kann der Nachweis von GFAP auf Grund von dessen Spezifität für Astroglia als wichtiges Hilfsmittel dazu dienen, den vorherrschenden Zelltyp eines Tumors und den Grad der Zelldifferenzierung zu bestimmen (ENG, 1982). In nahezu allen Arten glialer Tumoren einschließlich Ependymomen, Oligodendrogliomen, Astrozytomen, Gliosarkomen, Angiogliomen, Astroblastomen und in den morphologisch höher differenzierten Arealen von Glioblastomen konnte GFAP nachgewiesen

werden (de ARMOND et al., 1980; BONNIN und RUBINSTEIN, 1984; BULLARD und BIGNER, 1985).

DELPECH et al. (1978) machen den Gehalt an GFAP in Tumorextrakten abhängig von der relativen Anzahl maligner Astrozyten, dem Anteil an Nekrosen und der Verunreinigung mit gesundem Gewebe. Das Vorkommen des sauren Gliafaserproteins in einem Medulloblastom erklären sie mit astrozytärer Differenzierung im Tumorgewebe, da verschiedene Arten zellulärer Differenzierung in eben dieser Tumorart vorkommen können.

Auch in anderen Tumoren konnten GFAP-positive Zellen gefunden werden, z. B. in Pinealoblastomen, Ependymoblastomen und in einer kleinen Anzahl gering differenzierter supratentorialer Tumoren von Kindern. Diese Tumoren bestehen hauptsächlich aus primitiven Zellen, und die Erklärung für das Vorkommen von GFAP liegt in dem in diesen Zellen vorhandenen Potential zu astrozytärer Differenzierung (BONNIN und RUBINSTEIN, 1984).

Einen Bezug zwischen dem Gehalt an GFAP und der Malignität von Gliomen stellten DITTMANN et al. (1977) her. Mit steigender Entdifferenzierung der Zellen sank der Gehalt an saurem Gliafaserprotein (JAQUE et al., 1979).

3.2. Gliomassoziierte Antigene

Tumorzellen exprimieren Oberflächenantigene, die auf normalen Zellen nicht vorkommen (HERBERMANN, 1977; KENNETT et al., 1980). Durch Untersuchungen der zellulären und humoralen Immunantwort von Gliompatienten wurden solche gliomassoziierten Antigene nachgewiesen

(WAHLSTRÖM et al., 1973; KORNBLITH et al., 1974; PFREUNDSCHUH et al., 1978). Dieser Nachweis gelang auch bei experimentellen Gliomen (TROUILLAS, 1971; STAVROU et al., 1977, 1978).

In der Folgezeit wurden viele Versuche mit Heteroantiseren gegen Gliome durchgeführt. COAKHAM und Mitarbeiter (1974, 1975) immunisierten Kaninchen mit kultivierten Astrozytomzellen und kamen, nachdem nur durch Absorption mit homogenisiertem Astrozytomgewebe sämtliche cytotoxische Serumantikörper entfernt werden konnten, zu dem Schluß, daß ein astrozytom-assoziiertes Antigen existieren muß. Ähnliche Ergebnisse wurden durch die Anwendung von Heteroantiseren auch von anderen Autoren erzielt (WIKSTRAND et al., 1977, 1979; SCHNEGG et al., 1981a).

Diese Untersuchungen führten zur Definition 3 verschiedener Klassen von Zelloberflächenantigenen bei Gliomen:

1. Antigene, die den Zellen neuroektodermalen Ursprungs gemeinsam sind.
2. Antigene, die sowohl in malignen Gliomzellen als auch in normalen Hirnzellen exprimiert werden.
3. Antigene, die nur bei Gliomen auftreten.

Mit der Einführung der Hybridomtechnologie (KÖHLER und MILSTEIN, 1975) konnte mittels monoklonaler Antikörper eine genauere Charakterisierung und Klassifizierung gliomassoziiierter Antigene erfolgen.

Gegen eine Vielzahl von Tumoren des Menschen wurden monoklonale Antikörper entwickelt, wie z. B. gegen Melanome (HERLYN et al., 1980; CARREL et al., 1982), Lymphome (NADLER et al., 1980), Gliome (SCHNEGG et al., 1981b; SEEGER et al., 1981) sowie Neuroblastome (CARREL et al., 1982). SCHNEGG et al. (1981b) entwickelten 3

monoklonale Antikörper, von denen 2 vorwiegend mit Gliomzellen reagierten. Der dritte Antikörper erkannte auch Antigene auf Melanomen und Neuroblastomen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von WIKSTRAND und BIGNER (1982) überein, die Kreuzreaktionen von monoklonalen Antikörpern gegen fetale Hirnzellen des Menschen mit Glioblastomen, Melanomen und Neuroblastomen fanden. Mit Tumoren nicht-neuroektodermalen Ursprungs und adultem Hirngewebe konnte jedoch keine Bindung beobachtet werden, eine Tatsache, die von anderen Autoren bestätigt wurde (KENNETT et al., 1979, 1980; SEEGER et al., 1981).

C. PROBLEMSTELLUNG

Maligne Gliome zeichnen sich durch eine ausgeprägte Heterogenität ihrer Zellpopulation aus. Auch zwischen Zelllinien, die aus solchen Tumoren etabliert wurden, besteht diese Heterogenität. Phänotypische und genotypische Merkmale können nicht nur zwischen Zelllinien, die aus histologisch vergleichbaren Tumoren etabliert wurden, variieren, sondern auch innerhalb einer Zelllinie und deren Klone (SHAPIRO et al., 1979).

Die phänotypische Heterogenität von Gliomen wird durch Unterschiede in Morphe, Wachstumsverhalten, Expression von biochemischen Markern, Expression gliomassoziierter Antigene, Tumorigenität in Nacktmäusen und Reaktion auf Chemotherapeutika zum Ausdruck gebracht (BULLARD et al., 1981; BIGNER et al., 1981a; BIGNER, 1981).

Im Zuge der in vitro Etablierung von Tumorzellen können milieubedingte Veränderungen auftreten, die als Folge einer erhöhten Rate an Spontanmutationen bzw. genetisch bedingten klonalen Variationen aufzufassen sind. Daraus erwächst die Notwendigkeit, anhand definierter Parameter eine dauernde Kontrolle der Zelllinien durchzuführen. Dies umso mehr als für die Untersuchung sowohl zellbiologischer als auch histogenetischer Fragen die Vergleichbarkeit des Zellmaterials mit dem Ursprungstumor unabdingbare Voraussetzung darstellt.

Die vorliegende Arbeit hatte daher die in vitro Etablierung und Charakterisierung von Gliomzelllinien humanen Ursprungs zum Ziel. Im einzelnen sollten die gezüchteten Zelllinien hinsichtlich morphologischer

Eigenschaften, Markerproteinen, Antigenexpression, Wachstumsverhalten, Karyotyp und Tumorgenität untersucht werden.

D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methoden

1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere standen thymusaplastische SWISS-nu/nu und NMRI-nu/nu Nacktmäuse beiderlei Geschlechts zur Verfügung. Sie wurden in keimarmer Umgebung unter standardisierten Bedingungen (24 - 26° RT, ca. 60 % Luftfeuchtigkeit, 10 - 15facher Luftwechsel pro Stunde, 10 Stunden Beleuchtung pro Tag) (FORTMEYER, 1981) in Makrolon^R-Käfigen gehalten.

Die Tiere erhielten Altromin^R als Diätfutter und mit 1M HCl auf pH 2,5 - 3 angesäuertes Wasser ad libitum.

1.2. Tumormaterial

Die Etablierung der Zelllinien erfolgte aus Operationsmaterial, das von der Abteilung für Neurochirurgie des Klinikums München-Bogenhausen zur Verfügung gestellt wurde. Die Weiterverarbeitung erfolgte unter sterilen Bedingungen innerhalb eines Zeitraumes von 1 Stunde.

Tumor Nr.	Diagnose	Zelllinie
N39/86	Astrozytom III	86HG-39
N28/87	Glioblastom	87HG-28
N31/87	Astrozytom III	87HG-31

1.2.1. Histologische Untersuchung

Für die sofortige histologische Beurteilung des Tumors wurde ein Gefrier-Schnellschnitt angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Weitere Gewebstückchen wurden jeweils in 0,5%igem Formalin und in Bouin'scher Lösung (1 ml Eisessig, 5 ml Formalin, 15 ml Pikrinsäure) zur späteren Paraffineinbettung konserviert.

Für zellmorphologische Untersuchungen wurden Deckgläschenkulturen in "Leighton-tubes" angelegt und gefärbt. Die Lamellen wurden dreimal in PBS-A (Ca^{++} - und Mg^{++} -freie Phosphate-Buffered-Saline, pH 7,2) gewaschen, 30' in Bouin-Lösung fixiert und anschließend zweimal in 96%igem Alkohol und zweimal in 70%igem Alkohol bis zum Verschwinden der gelben Farbe gewaschen. Dann erfolgte die 30-minütige Färbung mit Hämatoxylin. Nach dem anschließenden Wässern in lauwarmem Wasser wurden die Lamellen 1' mit Eosin gefärbt. Nach zweimaligem Spülen in Aqua dest. und anschließendem Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe sowie in Xylol wurden die Präparate in Kanadabalsam eingeschlossen.

1.2.2. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung¹⁾

In Leighton-tubes angelegte Deckgläschenkulturen wurden in 1%igem phosphatgepuffertem Glutaraldehyd (pH 7,3) 24 Stunden fixiert und anschließend dreimal mit Phosphat-

1) Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau I. Eberl (Institut für Experimentelle Chirurgie des Klinikums Rechts der Isar, Vorstand Prof. Dr. G. Blümel) durchgeführt.

puffer gespült. Die Entwässerung erfolgte zuerst in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Der Alkohol wurde alsdann in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe durch Amylacetat ausgetauscht. Die Trocknung erfolgte nach der kritischen Punkt-Methode. Die Herstellung der Leitfähigkeit erfolgte mit einer Gold-Paladium-Legierung in einer Kathodenzerstäubungsanlage (Polaron). Die Bilder wurden mit einem AMR-Leitz 1200B-Gerät hergestellt.

1.3. Zellmaterial

1.3.1. Tumorzellkulturen

Die Anzüchtung der Tumorzellkulturen erfolgte nach der mechanischen Gewebedissoziationsmethode (PAUL, 1980) bzw. der Explantationsmethode. Die zerkleinerten Gewebestückchen wurden unter sterilen Bedingungen in 50 ml- bzw. 260 ml-Plastikflaschen (Nunc, Roskilde, Dänemark, Nr. 1-63371 bzw. 1-53732) überführt und mit HC-Medium als Nährmedium überschichtet. Als Grundmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Karlsruhe, Nr. 074-2100), dem pro Liter 20 % fetales bovines Serum (FBS; Flow Laboratories, Meckenheim, Nr. 29-101-54), 10 % NCTC-135 Medium (Gibco, Karlsruhe, Nr. 041-01350), 1 % Natriumpyruvat (Gibco, Karlsruhe, Nr. 043-01360), 100 000 I.E. Penicillin, 0,1 g Streptomycin (Pen.-Strept., Gibco, Karlsruhe, Nr. 061-5075) und 0,1 g Neomycin (Sigma, Deisenhofen, Nr. N-1876) zugesetzt wurden. Das FBS wurde vor Gebrauch 30' bei 56 °C inkubiert, um etwaige Komplementfaktoren zu inaktivieren.

Die Bebrütung der Zellkulturen erfolgte im offenen System bei 37 °C mit 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit.

Nach dem Anwachsen der Kulturen konnte der Gehalt an FBS auf 10 % gesenkt werden.

1.3.2. Subkulturen

Die Herstellung der Subkulturen erfolgte nach dem Trypsinierungsverfahren, wobei die Primärkulturen entsprechend ihres Wachstums in regelmäßigen Abständen im Verhältnis 1 : 5 bis 1 : 30 geteilt wurden.

Nach Überschichten des Zellrasens mit einer STV-Lösung (100 ml Saline 10-fach, 25 ml 1,25%ige Trypsinlösung, 50 ml 1%ige Versenelösung, Aqua bidest. ad 1000 ml) wurde vorsichtig gewaschen und anschließend die Waschlösung abgesaugt. Nun wurden erneut, je nach Größe der Flasche, 1 - 2 ml STV-Lösung hinzugefügt und ca. 3 - 5' auf dem Zellrasen belassen, bis sich alle Zellen vom Boden gelöst hatten. Anschließend erfolgte die Resuspendierung mit Nährmedium und je nach gewünschtem Teilungsverhältnis wurde eine entsprechende Menge der Zellsuspension in eine neue Plastikflasche überführt.

1.3.3. Konservierung und Lagerung der Tumorzellen

Um die Möglichkeit zu erhalten, auf frühere Passagen der Zelllinien zurückgreifen zu können, wurden in regelmäßigen Zeitabständen Zellen eingefroren.

Nach dem Ablösen des Zellrasens mit der Trypsinierungsmethode wurden die Tumorzellen 5' bei 800 U/min

abzentrifugiert, anschließend das Sediment in Nährmedium mit 20 % FBS suspendiert und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Serva, Heidelberg, Nr. 20385) zugesetzt.

Die Konzentration der Zellsuspension wurde auf 10^6 Zellen/ml eingestellt, jeweils 1 ml in sterile Cryotubes (Nunc, Roskilde, Dänemark, Nr. 3-63401) abgefüllt und nach 4-stündiger Lagerung bei 4°C bei -80°C tiefgefroren. Das Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C innerhalb einer Minute. Durch Zentrifugieren wurde das im Medium befindliche DMSO entfernt und die suspendierten Zellen in Plastikflaschen ausgesät.

1.3.4. Generationszeit

Die Tumorzellen wurden nach der Trypsinierungsmethode geerntet, 5' bei 800 U/min zentrifugiert, resuspendiert und gezählt (Coulter Counter, Counter Electronics, Harpenden, U.K.). Die Zellzahl wurde durch Verdünnen auf 20.000/ml eingestellt und 1 ml dieser Suspension in jede Vertiefung einer 24-Loch-Linbroplatte pipettiert. In 3-stündigen Abständen wurden aus je zwei Löchern die Zellen abtrypsiniert und im Coulter Counter gezählt bis die Zellzahl sich verdoppelt hatte.

1.3.5. "Plating efficiency"

Einzelzellsuspensionen wurden, wie unter 1.3.4. beschrieben, hergestellt und jeweils 100, 500 und 1000

Zellen in Petrischalen mit einem Durchmesser von 50 mm ausgesät.

Die Kulturen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet. Nach 12 Tagen wurden die Zellen in Methanol fixiert und mit Giemsa-Lösung gefärbt und 4 oder mehr eng zusammenliegende Zellen wurden als eine Kolonie gezählt.

1.3.6. Klonierung

Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension, wie beschrieben, wurde unter lichtmikroskopischer Kontrolle durch Verdünnen mit Medium die Zellzahl so eingestellt, daß sich in einem Tropfen der Pasteurpipette 1 - 4 Zellen befanden. Sodann wurde in jedes Loch einer 96-Loch-Linbroplatte ein solcher Tropfen pipettiert und Medium mit 15 % FBS, dem conditioniertes Medium im Verhältnis 1 : 2 zugesetzt war, hinzugefügt.

Die Herstellung des conditionierten Mediums (CM) erfolgt durch Sammeln und Abzentrifugieren des Überstandes sehr gut wachsender Tumorzellkulturen, der mehrmals bei -20 °C eingefroren und wieder aufgetaut wurde (CHEN et al., 1975). Dadurch wurden proliferationsfähige Zellen zerstört und somit eine Verunreinigung der zu klonierenden Zellen verhindert. Zur Sterilitätskontrolle wurde das CM außerdem noch 2 Tage bei 37 °C inkubiert.

Nach 15 - 20 Tagen waren in einigen Vertiefungen Zellkolonien gewachsen. Diese wurden abtrypsiniert und nach der gleichen Methode erneut zweimal kloniert und die Subklone als permanente Tumorzellkulturen weitergezüchtet.

1.3.7. Behandlung von Gliomzellen mit db-cAMP

Das cyclische Adenosin-3'5'-Monophosphat ist generell in Zellen vorhanden und an enzymatischen Reaktionen beteiligt (JOST und RICKENBERG, 1971).

Durch die Zugabe von N_6O_2 -Dibutyryl-Adenosin-3'5'-Monophosphat-Natriumsalz (db-cAMP), eines Nukleotid-Derivates, zum Nährmedium wird die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht (MACINTYRE et al., 1972) und dadurch werden Änderungen im Wachstumsverhalten und der Zellmorphie ausgelöst.

Aus 50 mg db-cAMP (Sigma, Deisenhofen, Nr. D-0627) und 4 ml Aqua bidest. wurde eine 0,25 mM Lösung hergestellt, diese mittels eines Millipore-Filters (Sartorius, Nr. 6400104) steril filtriert und bei $-20^{\circ}C$ tiefgefroren (STEINBACH und SCHUBERT, 1975).

Es wurden Kulturen von Gliomzellen auf Glaslamellen angelegt und diese mit 0,2 ml der 0,25 mM Lösung in 5 ml Nährmedium überschichtet. Eine lichtmikroskopische Kontrolle erfolgte nach 8, 12 und 24 Stunden. Nach dieser Zeit wurden die Kulturen fixiert und gefärbt. Zum Vergleich wurden von den gleichen Zelllinien auch unbehandelte Präparate angefertigt. Außerdem wurden für rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen "cover slips", wie in Punkt 1.2.2. dargestellt, behandelt.

1.3.8. Chromosomendarstellung²⁾

Für eine erfolgreiche Chromosomenanalyse ist grundsätzlich eine möglichst große Zahl von Zellen in Mitose er-

2) Die Chromosomenanalyse wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. B. Wöhler durchgeführt.

forderlich. Um dies zu erreichen, wurden die Zellen 1 bis 2 Tage zuvor gesplittet, um die Zellkultur stärker zu synchronisieren.

1 bis 3 Stunden vor der Chromosomenpräparation wurde der Zellkulturflasche 0,4 µg/ml Medium Colcemid (Ciba) steril zugesetzt. Die Dauer der Einwirkzeit variierte je nach Tumor und diente der Blockierung der Zellteilung in der Metaphase und somit einer Anreicherung von Mitosen. Die Gewinnung von Mitosen erfolgte unter sterilen Bedingungen, um den verbliebenen Zellrasen für neue Präparationen weiter kultivieren zu können. Der Überstand der Kulturflasche wurde in ein spitzes Zentrifugenröhrchen gegeben. Pro Flasche gab man 1 ml PBS-Trypsin (0,25%ig) und 4 ml PBS-A steril hinzu. Mit Hilfe eines inversen Mikroskopes wurde dann die Ablösung der Mitosen kontrolliert, die bei Bedarf durch vorsichtiges Klopfen unterstützt wurde. Bevor sich der Zellrasen abkugelte, wurde der Flascheninhalt gleichfalls in das Zentrifugenglas überführt. Anschließend spülte man 1- bis 2-mal mit Medium nach, gab dieses Medium ebenfalls in das Zentrifugenglas und zentrifugierte 10' bei 200 x g. Der Überstand wurde abgesaugt. Es folgte eine Hypotoniebehandlung mit 1 ml 0,5%iger KCl mit anschließender Inkubation bei 37 °C. Die optimale KCl-Behandlung variierte je nach Tumor zwischen 10' und einer halben Stunde. Es wurde wieder bei 200 x g 8' zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Die Hypotoniebehandlung ermöglichte durch die beträchtliche Volumenzunahme der Zelle ein Auseinanderrücken der Chromosomen der in der Mitose befindlichen Zellen und somit eine bessere Chromosomendarstellung. Die

Fixierung erfolgte in einem frisch angesetzten Gemisch aus Eisessig/Methanol 1 : 3 (Carnoy's Fixativ). Die Fixierungszeit betrug 45' bei 4 °C. Es wurde nochmals 15' zentrifugiert und das Fixativ gewechselt. Das Zellsediment wurde in einem kleinen Volumen Fixierlösung resuspendiert und in eine Pipette aufgesaugt. Die fixierten Tumorzellen wurden auf einen mit eiskühlem, destillierten Wasser benetzten Objektträger aufgetropft und der Objektträger anschließend luftgetrocknet.

Die differentielle Färbung der Chromosomen, das "Bändern" ("banding"), stellt einen wichtigen Faktor der Karyotypenanalyse dar. Bei der Durchführung der Giemsa-Bandenfärbung wurden die Präparate mit einer Trypsinlösung vorbehandelt. Dies setzte eine Stabilität der Präparate voraus, die erst nach ca. 4 Tagen Lufttrocknung erreicht werden konnte. Man tauchte die Objektträger 30 sec. in eine 0,0125%ige Trypsinlösung (Trypsin Difco-0152-15-9). Nach Waschen in PBS-A wurden die Präparate kurz in eine Alkoholreihe von 70-, 80- und 90%igem Alkohol getaucht und 6' in einer 2,5%igen Giemsalösung gefärbt (2,5 ml Giemsalösung, Merck, 30 ml Sörensenpuffer pH 6,8 ad 100 ml Aqua dest.). Anschließend wurden die Präparate in Aqua dest. gespült und getrocknet. Nach Eintauchen in Xylol wurden sie mit Eukitt eingeschlossen.

Von jeder untersuchten Tumorkultur wurden mindestens 30 Mitosen mit Immersionsoptik photographiert (Zeiss Photomikroskop II, Neofluar 100/1,25, Agfa-Ortho Film) und ausgewertet. Die Chromosomen konnten mit Hilfe der Bandenfärbung auf Verluste und Strukturveränderungen untersucht werden.

1.4. Transplantation von Tumoren

Zur Ermittlung der Tumorigenität humaner Gliome in NMRI-nu/nu und Swiss-nu/nu Nacktmäusen wurden mehrmals Tumorzellen implantiert.

1.4.1. Subkutane Transplantation

Die in Kultur wachsenden Zellen wurden, wie beschrieben, geerntet, nach dem Zentrifugieren gezählt und 1×10^7 Tumorzellen in 0,2 - 0,3 ml Medium resuspendiert. Nachdem die Mäuse mit Äther narkotisiert waren, wurde die Zellsuspension seitlich am Thorax subcutan deponiert.

Es wurden jeweils 8 SWISS/nunu und 8 NMRI/nunu Nacktmäuse für die Transplantation der drei Tumorzelllinien verwendet. Zur Immunsuppression wurden 8 NMRI/nunu Nacktmäuse drei Tage vor der Implantation der Zelllinien 87HG-28 und 87HG-31 mit 0,3 ml Dexamethason und 0,1 ml Cyclosporin A behandelt. Eine Wiederholung der Behandlung erfolgte nach 3, 6 und 9 Tagen.

1.4.2. Intracerebrale Transplantation

Die Implantation von $1 - 5 \times 10^5$ Zellen, resuspendiert in 0,05 ml Medium erfolgte nach Perforation der Schädeldecke mit der Injektionsnadel paramedian in Höhe des Scheitelbeines in die Großhirnrinde.

1.4.3. In vitro Etablierung von Zelllinien aus Transplantationstumoren

Sobald die Tumoren eine Größe von ca. 2 cm³ erreicht hatten bzw. das Allgemeinbefinden der Mäuse stark beeinträchtigt war, wurden die Tiere in Äthernarkose durch Genickdislokation getötet und die Tumoren unter sterilen Bedingungen explantiert. Der von Haut und Bindegewebe befreite Tumor wurde in eine sterile Petrischale überführt und mit einem Skalpell zerkleinert. Ein Teil der Explantate wurde direkt in Gewebekulturflaschen überführt. Der andere Teil wurde mit 1,25%iger Trypsinlösung überschichtet, mit Nährmedium aufgefüllt und nach Überführen in ein steriles Zentrifugenröhrchen 5' bei 800 U/min. zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit frischem Medium suspendiert und in eine Gewebekulturflasche überführt.

1.5. Nachweis gliaassoziiierter Antigene

1.5.1. Indirekte Immunperoxidasefärbung

Zum Nachweis des S-100 Proteins wurde die indirekte Immunperoxidasefärbung von Cytospin-Präparaten angewandt.

Die Objektträger wurden 15' in 200 ml Methanol und 5 ml 30%ige H₂O₂ bei Raumtemperatur getaucht, sodann 3 x 15' in PBS-A gewaschen. Nach dem Lufttrocknen erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit normalem Kaninchenserum (1 : 100 mit PBS-A verdünnt) bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Kaninchenserum mit einem saugfähigen

Tuch entfernt, der Objektträger mit dem Primärantikörper (Rabbit immunglobulins to cow S 100; Dakopatts, Hamburg, Nr. Z-311) bei 37 °C 30' inkubiert und weitere 3 x 5' mit PBS-A gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper (Peroxidase-conjugated rabbit immunglobulins to mouse immunglobulins, Dakopatts, Hamburg, Nr. P260) 30' bei 37 °C und anschließend wurde wieder 3 x 5' mit PBS-A gewaschen. Zur Darstellung der Antigen-Antikörper-Reaktion wurde 10 - 30' mit Substrat nach NEXØ (1977) inkubiert: 20 mg Amino-9-ethylcarbazol (AEC; Sigma, Deisenhofen, Nr. A-5754), gelöst in 5 ml N-Dimethyl-formamid (DMFA; Merck, Darmstadt, Nr. 3034), aufgefüllt mit 50 mM Acetatpuffer (pH 5,0) ad 100 ml, filtriert und unmittelbar vor Gebrauch 50 µl 30%ige H₂O₂ zugegeben. Die Farbreaktion wurde durch kurzes Waschen mit PBS-A gestoppt, die Objektträger 1' mit Hämalaun gefärbt und nach 10-minütigem Gegenfärben unter fließendem Wasser mit Kaisers Glyceringelatine eingeschlossen.

Der Nachweis des GFA-Proteins erfolgte auf konfluent bewachsenen Glaslamellen ebenfalls mit der indirekten Immunperoxidasemethode. Die Lamellen wurden nach einmaligem Waschen in PBS-A mit 4 °C kaltem Methanol/Aceton im Verhältnis 1 : 1 5' fixiert und zur Blockierung der endogenen Peroxidase 5' in 7,5%iger H₂O₂ inkubiert. Anschließend erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit dem ersten Antikörper (Rabbit immunglobulins to cow GFAP; Dakopatts, Hamburg, Nr. Z-334) bei 37 °C und nach 6-maligem Waschen mit PBS-A weitere 60' mit dem 2. Antikörper (Anti-rabbit immunglobulins peroxidase conjugated; Sigma, Deisenhofen, Nr. 96F-8890). Die weitere

Behandlung mit Substrat nach NEXØ wurde, wie zuvor beschrieben, durchgeführt.

1.5.2. Immunofluoreszenz

Als weitere immunhistochemische Methode zum Nachweis der gliaspezifischen Antigene S-100 und GFAP wurde die indirekte Immunofluoreszenztechnik (Sandwich-Technik, COONS, 1957) angewendet. Es wurden nicht zu dicht bewachsene Glaslamellen und Cytospin-Präparate verwendet. Die Präparate wurden 3 x 5' in PBS-A gewaschen, 30 sec in kaltem Aceton (4 °C) fixiert und 5' bei Zimmertemperatur getrocknet. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Anti-GFAP- bzw. Anti-S-100-Serum 30' bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Nach 3-maligem Waschen mit PBS-A für 5' wurden die Präparate getrocknet und weitere 30' bei 37 °C mit Fluoresceinisothiocyanatgekoppeltem Anti-Kaninchen-Globulin vom Schaf (1 : 32, Cappel Laboratories, Cochranville, USA, Nr. 11290) inkubiert. Die Präparate wurden 3-mal in PBS-A gewaschen und mit gepuffertem Glycerol eingeschlossen.

1.6. Nachweis gliomassoziiierter Antigene

1.6.1. Indirekte Immunperoxidasefärbung

Zum Nachweis gliomassoziiierter Antigene wurden semikonfluent bewachsene Terasakiplatten (Nunc, Roskilde, Dänemark, Nr. 1-63118) und Glaslamellen verwendet. Nach 1-maligem Waschen in PBS-A, 5-minütiger Fixation in Methanol/Aceton 1 : 1 (4 °C) und anschließender Luft-

trocknung erfolgte die Inkubation mit 20 µl des Hybridomüberstandes (1. Antikörper) bei 37 °C für 60'. Als 1. Antikörper wurden die monoklonalen Antikörper MUC 8-22, 2-63, 2-39 und 7-39, die gegen gliom-assoziierte Antigene gerichtet sind, verwendet (STAVROU et al., 1987). Diese monoklonalen Antikörper werden produziert von Hybridomen, die aus der Fusion von Mausmyelomzellen (X63-Ag8.653) und Splenozyten entstanden sind. Die Splenozytenspender wurden jeweils mit in vitro kultivierten Gliomzellen humanen Ursprungs (85HG-63, 86HG-39) und mit aus Biopsiematerial eines malignen Glioms präparierten Zellen (N22/85) immunisiert (MARTIN, 1988).

Bei einem Teil der Zellen wurde die Färbung ohne Fixation durchgeführt. Anschließend erfolgten 6 Waschvorgänge mit PBS-A und die Inkubation mit dem 2. Antikörper, wie unter Punkt 1.5.1. beschrieben, jedoch für 60'. Zur Darstellung der Antigen-Antikörper-Reaktion mit Substrat nach NEXØ (1977) siehe unter Punkt 1.5.1.

1.6.2. Immunofluoreszenz

Für die Immunofluoreszenz wurden nicht zu dicht bewachsene Glaslamellen verwendet. Als 1. Antikörper diente wieder Hybridomüberstand, als 2. Antikörper wurde Fluoresceinisothiocyanat-konjugiertes Kaninchen-anti-Maus-Ig (Dakopatts, Hamburg, Nr. F-261), 1 : 10 verdünnt, verwendet. Die weitere Behandlung erfolgte entsprechend Punkt 1.5.2.

2. Ergebnisse

2.1. Lichtmikroskopie

2.1.1. Tumoren

(1) Histologisch handelt es sich bei der als Astrozytom WHO-Grad III klassifizierten Geschwulst N 39/86 im linken Frontallappen um einen zellreichen Tumor, der eine benachbarte Windung diffus infiltriert. Das Tumorparenchym ist durch einen relativ inhomogenen Aufbau charakterisiert und setzt sich aus Arealen mit in Zügen und Wirbeln gelagerten Zellen zusammen. Diese Tumorzellen sind klein bis mittelgroß, teilweise rund und überwiegend fusiform konfiguriert, mit chromatindichten Kernen und scheinen durch dichte Faserbildung miteinander verbunden. Diese Bezirke sind zudem vielfach von bindegewebigen Faserzügen durchsetzt. Stellenweise finden sich kleine Zellen, die noch astrozytäre Differenzierung mit Ausbildung von Zellfortsätzen erkennen lassen. Das Tumorgewebe wird vorwiegend durch kapilläre, aber auch durch klein- und mittelkalibrige Gefäße reichlich vaskularisiert. Es imponieren deutliche girlandenförmige Endothelproliferationen. Der Gehalt an Mitosen ist bei diesem Tumor ebenso wie die Kernpleomorphie erheblich ausgeprägt. An regressiven Erscheinungen beobachtet man landkartenartige Nekrosen, einige Strichnekrosen sowie kleine Einblutungen und diffuse Blutaustritte. Perivaskulär findet man häufig dichte lympho-plasmazelluläre Infiltrate.

(2) Die als Glioblastom eingeordnete Geschwulst N 28/87 stellt histologisch einen sehr zelldichten, hirneigenen

Tumor dar, der die angrenzenden Rindenabschnitte diffus infiltriert. Das Tumorparenchym wird geprägt von hochgradig zellichten Arealen mit mäßig zytoplasmahaltigen, oft in Wirbeln gelagerten Zellen, deren runde bis spindelförmige Kerne eine deutliche Hyperchromasie aufweisen. Sehr zahlreiche kleinkalibrige und kapilläre Gefäße mit girlandenförmigen Endothelproliferationen gewährleisten eine ausreichende Vaskularisation des Tumorparenchyms. An progressiven Veränderungen beobachtet man sowohl eine deutliche Kernpleomorphie und zahlreiche Mitosen als auch häufig auftretende mono- und multinukleäre Riesenzellen. An regressiven Erscheinungen sind neben landkartenartigen Nekrosen und Strichnekrosen flächige bzw. diffuse Hämorrhagien zu nennen. Stellenweise beobachtet man eine diffuse Durchsetzung des Gewebes mit bindegewebigen Faserzügen.

(3) In den Schnittpräparaten aus der linken parieto-occipitalen Übergangsregion sieht man die Manifestation des als Astrozytom WHO-Grad III eingeordneten zellichten Tumors N 31/87, der einen angrenzenden Rindenabschnitt diffus infiltriert. Der relativ inhomogene Aufbau des Tumorparenchyms ist gekennzeichnet durch mittel- bis hochgradig zellichte Areale mit vorwiegend in Zügen und Wirbeln gelagerten Zellen. Daneben findet man Zonen mit zytoplasmareichen, astrozytär differenzierten bzw. fortsatzbildenden Zellen mit runden bis ovalen, chromatindichten Kernen. Die Vaskularisation des Tumorgewebes wird durch sehr viele kapilläre und kleinkalibrige Gefäße, die erhebliche Endothelproliferationen aufweisen, gewährleistet. Zu den progressiven Veränderungen zählen neben einer mäßigen Mitoserate die erhebliche Kernpleomorphie, vor allem

der in Wirbeln gelagerten Zellen und das Auftreten mehrerer mononukleärer Riesenzellen. An regressiven Erscheinungen imponieren landkartenartige Nekrosen, mehrere Strichnekrosen und großflächige Einblutungen.

2.1.2. Zellkulturen

Die 3 kultivierten Gliome zeigen in vitro ein unterschiedlich schnelles Wachstum. Bei einer Subkultivierungsrate von 1 : 5 (86HG-39 und 87HG-28) bzw. 1 : 20 (87HG-31) beträgt die Passagezeit durchschnittlich 7 Tage (6 - 8). Die Zelllinien befinden sich in der 60. - 90. Passage und können somit als permanent bezeichnet werden.

Die morphologische Charakterisierung erfolgt auf der Basis des Wachstumsmusters bei Erreichen der Konfluenz, wobei 4 verschiedene Wachstumsformen unterschieden werden können:

Die fibroblastoide Wuchsform besteht aus Bündeln paralleler Zellen, in Wirbeln gelagert, wobei die Längsachsen der Kerne und des Zytoplasmas gewöhnlich in der gleichen Ebene liegen.

Die fascikuläre Wuchsform zeigt in einer Art verflochtenem Muster angeordnete Bündel paralleler Zellen und ähnelt stark der fibroblastoiden.

Die epitheliale Wuchsform besteht aus polygonalen Zellen, die mosaikartig angeordnet sind.

Die gliale Wuchsform erhält durch die miteinander verbundenen langen Fortsätze ein honigwabenartiges Aussehen.

(1) Die 86HG-39-Linie zeigt in vitro ein fibroblastoides Wachstumsmuster mit kleinen bis mittelgroßen, polygonalen und spindelförmigen Zellen, die vorwiegend kurze und dünne Fortsätze ausbilden. Die spindelförmigen Zellen sind zum Teil parallel in Zügen gelagert. Auch das vereinzelte Vorkommen sternförmiger, astrozytenähnlicher Zellen ist zu beobachten. Die ovalen, chromatindichten Kerne liegen oft randständig. Es finden sich mehrere mono- und multinukleäre Riesenzellen, deren Cytoplasma ein verwaschenes Aussehen besitzt (Abb. 1).

(2) Das fascikuläre Wachstumsmuster der Zelllinie 87HG-28 ist gekennzeichnet durch bi- bis multipolare, polygonale Zellen mit teils langen und dünnen, teils kurzen, stummelartigen Fortsätzen und einem großen Anteil bipolarer, spindelförmiger Zellen mit langen Fortsätzen. Das Cytoplasma färbt sich nur schwach an und es besteht eine erhebliche Kernpleomorphie. Mono- und multinukleäre Riesenzellen finden sich in wechselnder Anzahl (Abb. 2).

(3) Das fibroblastoide Wachstumsmuster der 87HG-31-Linie zeichnet sich durch spindelförmige, parallel in Zügen angeordnete uni- bis bipolare Zellen mit meist langen, dünnen Fortsätzen aus. Vereinzelt finden sich sternförmige, astrozytenähnliche und polygonale Zellen mit kurzen Fortsätzen. Die chromatindichten, ovalen Kerne liegen meist zentral. Mononukleäre Riesenzellen sind in wechselnder Anzahl vorhanden (Abb. 3).

2.2. Rasterelektronenmikroskopie

Bei geringer Vergrößerung sind im Rasterelektronenmikroskop Zellen in verschiedenen Konfigurationen zu finden. Vorherrschend sind flache Erscheinungsformen von spindelförmiger bis sternförmiger Gestalt. Die Fortsätze des Zytoplasmas haben eine Ausdehnung bis 100 μm . Auffallend ist ein Verlust der Kontaktinhibition, so daß die Zellen sich bei größerer Dichte gegenseitig überlagern.

Bei starker Vergrößerung sind auf der Zelloberfläche Blasen und Falten sowie kurze Mikrovilli sichtbar. Am Rand der Zellen sind Filopodien in verschiedener Länge ausgebildet (Abb. 1, 2, 3).

2.3. Effekt von db-cAMP auf Gliomzellen

2.3.1. Lichtmikroskopie

Die morphologischen Veränderungen nach der Behandlung der Zellkulturen mit N_6O_2 -Dibutyryl-Adenosin 3'5'-Monophosphat-Natriumsatz (db-cAMP) bestehen in der Ausbildung zahlreicher neuer Zellfortsätze und der Verlängerung und Verbreiterung bereits vorhandener. Außerdem kann eine Wachstumsdepression der behandelten Zellkulturen und damit verbunden auch eine Verminderung von Mitosen beobachtet werden.

Die Reaktion der nach ihrem Wachstumsmuster als fibroblastoid eingestuften Zelllinie 86HG-39 ist am ausgeprägtesten, die der ebenfalls als fibroblastoid bezeichneten Kultur 87HG-31 eindeutig, während bei der der fascikulär wachsenden 87HG-28-Kultur keine Reaktion

zu beobachten ist. Dies läßt den Schluß auf einen Zusammenhang zwischen der Morphologie und der Reaktion auf die Behandlung mit db-cAMP zu.

Die ersten lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen können 12 Stunden nach Zugabe von db-cAMP zum Nährmedium beobachtet werden und erreichen ihre stärkste Ausprägung nach 24 Stunden. Eine Verlängerung der Behandlungsdauer kann den Effekt nicht verstärken.

Bei den 87HG-28-Zellen bringt auch die Erhöhung der Konzentration an db-cAMP im Nährmedium nicht den gewünschten Erfolg (Abb. 1, 2, 3).

2.3.2. Rasterelektronenmikroskopie

Die auffallendsten Veränderungen bestehen in einem Wechsel zu vorwiegend spindelförmigen Zellen mit langen, dünnen Fortsätzen, so daß sich bei geringer Vergrößerung ein filigranartiges Erscheinungsbild bietet. Bei starker Vergrößerung sind auf der Zelloberfläche ein Verlust von Mikrovilli und Blasen zu bemerken. Filopodien werden in größerer Anzahl ausgebildet. Außerdem ist eine starke Kräuselung der Zelloberfläche zu beobachten (Abb. 1, 3).

2.4 Tumorigenität

Die Inokulation der Gliomzellen führte nur in einem Fall (86HG-39) nach einem Zeitraum von 3 - 4 Monaten zu Tumorstadium bei allen behandelten Mäusen. Bei Mäusen die mit den beiden anderen Zelllinien behandelt wurden, war nach 5 - 8 Tagen ein Tumor mit ca. 0,8 cm im

Durchmesser ausgebildet, der jedoch nach 10 - 14 Tagen vollständig zurückgebildet war. Auch die Behandlung der Mäuse mit Dexamethason und Cyclosporin A brachte nicht den gewünschten Erfolg.

Die mikroskopische Struktur der Transplantationstumoren weist große Ähnlichkeit mit der des Primärtumors auf. So bietet sich auch hier histologisch das Bild eines sehr zellreichen Tumorgewebes mit Arealen von in Zügen und Wirbeln gelagerten Zellen, jedoch erscheint der Aufbau homogener als im Originaltumor. Die Zellen sind klein bis mittelgroß, überwiegend rund und weisen nur eine geringe Differenzierung auf. Es finden sich viele Mitosen, sowie riesenzellähnliche Bildungen (Abb. 4).

2.5 "Plating efficiency" und Generationszeit

Die Ergebnisse für die "plating efficiency" und die Verdoppelungszeit der untersuchten Tumorzelllinien weisen deutliche Unterschiede auf und es ergeben sich bei 10 Bestimmungen pro Zelllinie folgende Durchschnittswerte (Tab. 1).

Tabelle 1: "Plating efficiency" (PE) und Generationszeit

Tumorzell- linien	PE(%)	Verdopplungs- zeit (Stunden)
86HG-39	11,06	14
87HG-28	0,72	48
87HG-31	1,38	20

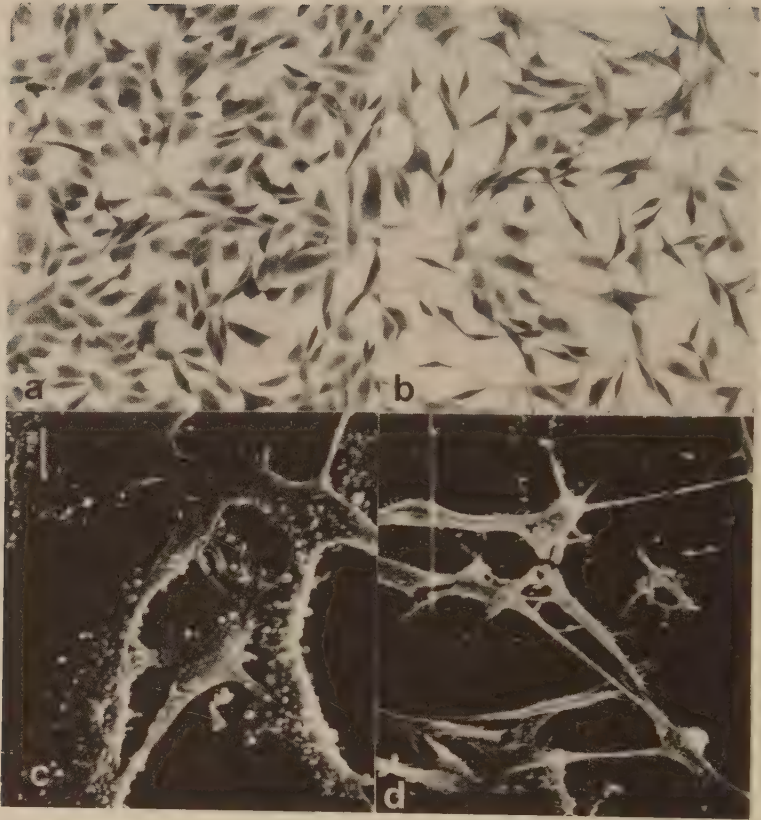


Abb. 1: Zelllinie 86HG-39 (72. Passage)

Semikonfluente Kultur des Astrozytoms N 39/86 mit spindelförmigen und polygonalen Zellen (a), die auf der Zelloberfläche Blasen und Filopodien ausbilden (c).

Die Behandlung der Kultur mit db-cAMP führt zu einer Wachstumsdepression. Die behandelten Zellen bilden zusätzliche feine Fortsätze aus (b) und zeigen einen Verlust von Blasen auf der Zelloberfläche (d).

a,b: HE-Fbg. x120

c,d: Rasterelektronenmikroskop, c x1200, d x600

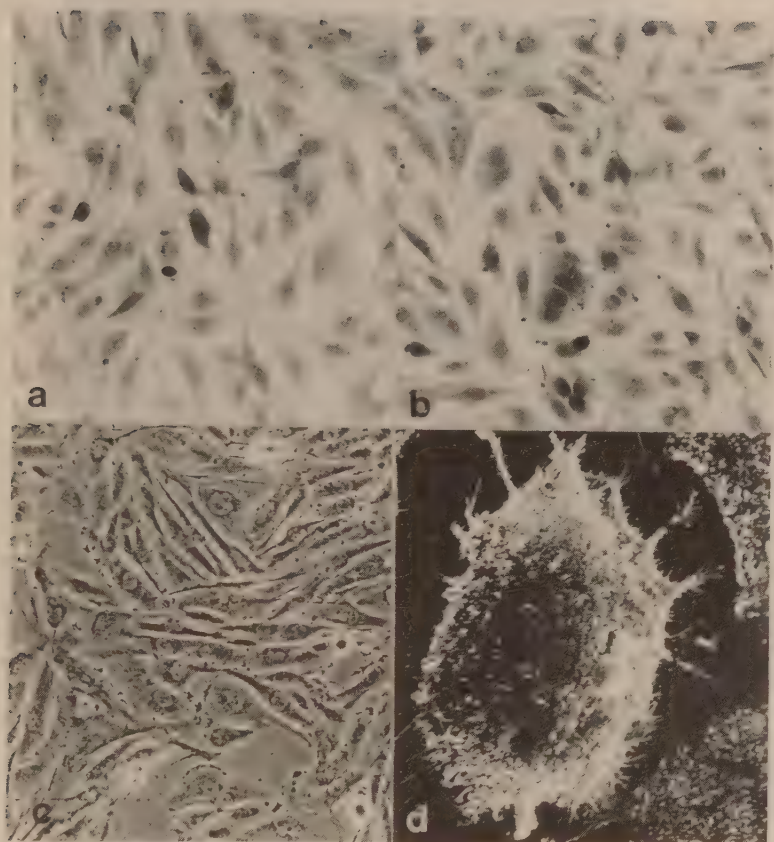


Abb. 2: Zelllinie 87HG-28 (49. Passage)

Zellkultur des Glioblastoms N 28/87 mit bi- und multipolaren Zellen, die teils lange und dünne, teils kurze, stummelartige Fortsätze ausbilden (a,c).

Keine sichtbaren Veränderungen nach Behandlung mit db-cAMP (b).

Ausbildung von Mikrovilli und Falten auf der Zelloberfläche (d).

a,b: HE-Fbg. x189

c : Phasenkontrast x120

d : Rasterelektronenmikroskop x1200

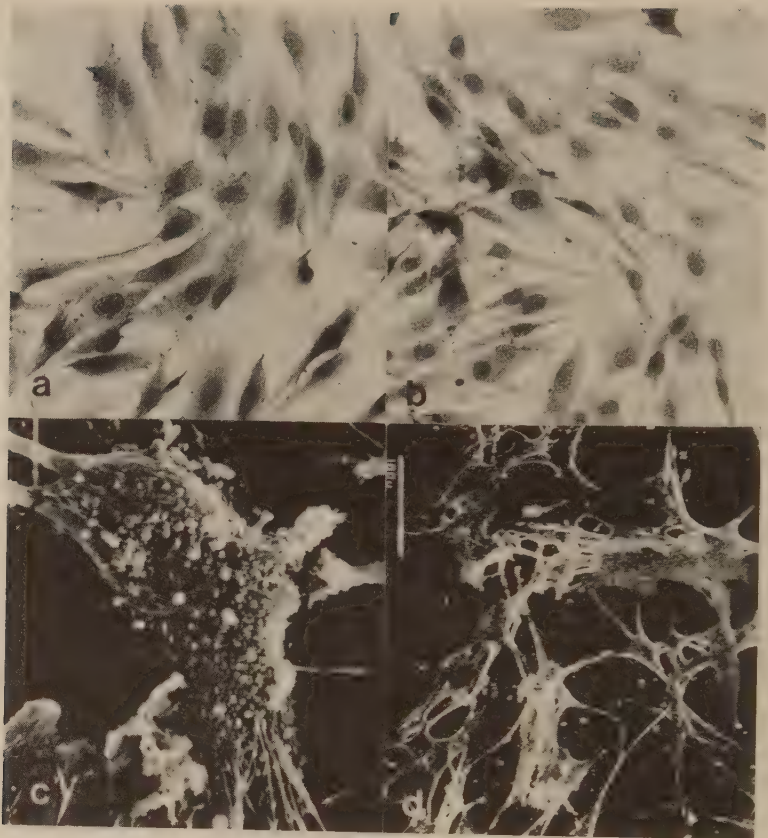


Abb. 3: Zelllinie 87HG-31 (62. Passage)

Aus dem Astrozytom N 31/87 etablierte Zelllinie mit spindelförmigen und polygonalen Zellen (a), die auf der Zelloberfläche Blasen sowie am Rand der Zellen Filopodien ausbilden (→) (c).

Nach Behandlung mit db-cAMP deutliche Ausbildung zusätzlicher langer Fortsätze (b,d).

a,b: HE-Fbg. x189

c,d: Rasterelektronenmikroskop, c x2400, d x240

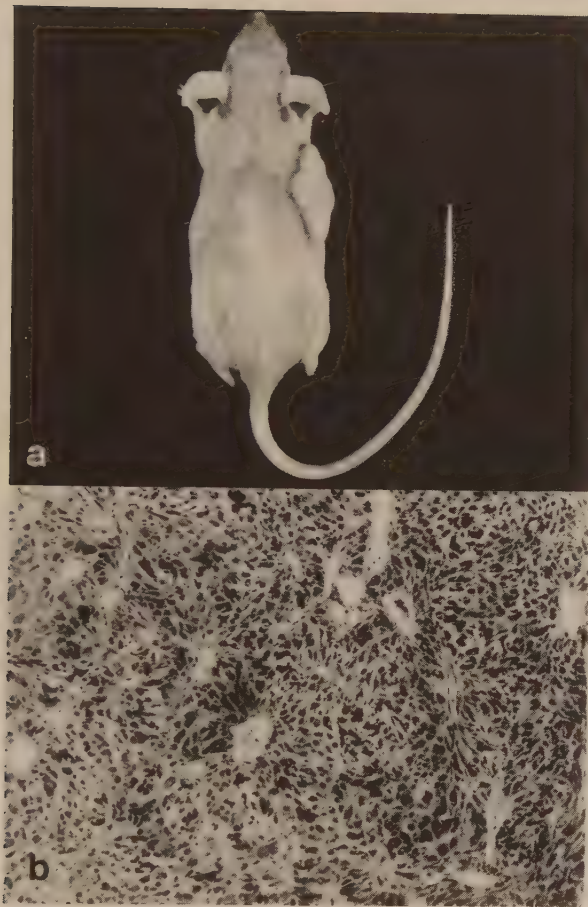


Abb. 4: Transplantationstumor 4 Monate nach Inokulation der Zelllinie 86HG-39 (a).

Mikroskopische Struktur des Transplantations-
tumors N 39/86-T1. Zelldichtes Tumorgewebe mit
Arealen von in Zügen und Wirbeln gelagerten
Zellen, die eine Gefäßorientierung zeigen (b)
x120.

Tabelle 2: Tumortransplantation in Nacktmäuse

Tumorzell- linie	Zellmenge	Tiere	Immunsupp- ression	Tumorstadium	Passage
86HG-39	1 x 10 ⁷ subkutan	8 SWISS/nunu 8 NMRI/nunu	nein	3-4 Monate post transplan- tationem bei allen Tieren	62. Passage
87HG-28	1 x 10 ⁷ subkutan	8 SWISS/nunu 8 NMRI/nunu	ja	Regression nach anfäng- lichem Wachs- tum	59. Passage 68. Passage
87HG-31	1 x 10 ⁷ subkutan	8 SWISS/nunu 8 NMRI/nunu	ja	Regression nach anfäng- lichem Wachs- tum	67. Passage 76. Passage

2.6 Chromosomenanalyse

(1) 86HG-39-Zelllinie

Die Analyse des Karyotyps wurde in der 27. in vitro Passage vorgenommen. Es wurden von 5 Mitosen Karyogramme erstellt und in 30 Mitosen die Chromosomenzahl ermittelt. Man fand eine Stammlinie im hypodiploiden bis diploiden Bereich mit hypotetraploiden bis tetraploiden Seitenlinien. Die folgende Karyotypisierung (Abb. 5) bezieht sich auf die Stammlinie: 38-46, XY, C9p+, t(49p ter::?), -C 13, mar 1, mar 2, mar 3

Bei dieser Linie wurde nur ein Markerchromosom, 9p+, gefunden. Zudem liegt eine Nullisomie der Chromosomen D13 vor, die sich allerdings nicht in allen Mitosen bestätigt.

(2) 87HG-28-Zelllinie

Anhand von 20 Giemsa-gefärbten Mitosen wurde die Anzahl der Chromosomen in der 56. in vitro Passage ermittelt.

Tabelle 3: Anzahl der Chromosomen bei 30 ausgewerteten Mitosen

1. Anzahl der Mitosen	10	15	5
2. Chromosomenzahl	39-41	60-68	76-88

Es handelt sich hier um eine Gliomzelllinie mit einer Stammlinie im hypodiploiden Bereich mit hypotetraploiden

den bis hypotriploiden Seitenlinien. Eine Karyotypisierung dieser Zelllinie wurde bislang nicht vorgenommen.

(3) 87HG-31-Zelllinie

Anhand von 30 Giemsa-gefärbten Mitosen wurde die Anzahl der Chromosomen in der 24. in vitro Passage ermittelt.

Tabelle 4: Anzahl der Chromosomen bei 30 ausgewerteten Mitosen

1. Anzahl der Mitosen	3	5	10	3	5	4			
2. Chromosomenzahl	72	73	74	75	76	77	78	79	80

Die Gliomzelllinie 87HG-31 besitzt somit einen Chromosomensatz im hypertriploiden Bereich. Eine Wiederholung der Chromosomenanalyse in der 64. Passage ergab keine Änderung, von 10 gezählten Mitosen hatten alle zwischen 74 bis 79 Chromosomen. Eine Karyotypisierung dieser Zelllinie wurde bislang nicht vorgenommen.

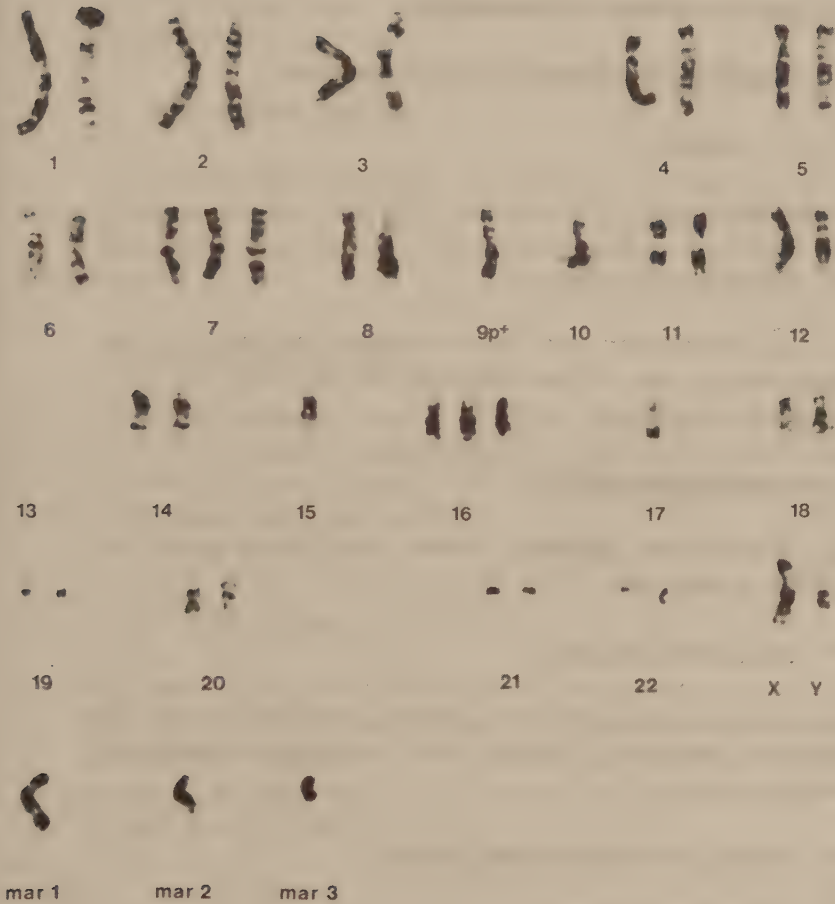


Abb. 5: Karyotyp der aus einem Astrozytom etablierten 86HG-39-Zelllinie (27. in vitro Passage). Bei allen untersuchten Mitosen konnte nur ein Markerchromosom (9p⁺) gefunden werden.

2.7 Immunologische Untersuchungen

2.7.1 Expression gliaassoziierter Antigene

2.7.1.1 Tumoren

I. S-100 Protein

(1) Astrozytom (N 39/86)

Im Paraffinschnitt kann man einzelne Zellen, die ein schwaches intrazytoplasmatisches Reaktionsprodukt aufweisen erkennen.

(2) Glioblastom (N28/87)

Im vorliegenden Präparat lassen sich keine positiven Zellen nachweisen.

(3) Astrozytom (N31/87)

Im vorliegenden Präparat weisen mehrere nicht in Wirbeln gelagerte Zellen eine intrazytoplasmatische Anfärbung auf.

II. Saures Gliafaserprotein (GFAP)

(1) Astrozytom (39/86)

Im Schnittpräparat zeigt sich eine Mischung aus positiv und negativ reagierenden Zellen. Sowohl die in Zügen und Wirbeln angeordneten Zellen, als auch die noch astrozytär differenzierten Zellen, weisen eine deutli-

che Anfärbung der Perikaryen und teilweise der Zellfortsätze auf.

(2) Glioblastom (N28/87)

Im Schnittpräparat finden sich überwiegend negativ reagierende Zellen. Nur an vereinzelt Zellen kann ein intrazytoplasmatisches Reaktionsprodukt nachgewiesen werden.

(3) Astrozytom (31/87)

Im Schnittpräparat erkennt man bei mehreren, durchwegs nicht in Wirbeln gelagerten Zellen, eine positive Reaktion, die sich als intrazytoplasmatisches Reaktionsprodukt darstellt.

2.7.1.2 Zellkulturen

Bei den aus den 3 Tumoren etablierten Zelllinien wurde der Nachweis gliaassoziierter Antigene mit Hilfe der indirekten Immunperoxidasefärbung und der Immunfluoreszenz durchgeführt. Eine Auflistung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Expression gliaassoziierter Antigene

Tumorzell- linie	S-100		GFAP	
	IPF	IF	IPF	IF
86HG-39	+	+	+	+
87HG-28	-	-	+	+
87HG-31	+	+	+	+

IPF: indirekte Immunperoxidasefärbung

IF : Immunfluoreszenz

2.7.2 Expression gliomassoziierter Antigene

2.7.2.1 Tumoren

(1) Astrozytom (N39/86)

Im Gefrierschnitt werden durch den monoklonalen Antikörper MUC 2-63 mehrere Tumorzellen angefärbt, während bei der Verwendung von MUC 8-22 nur vereinzelte Tumorzellen eine positive Reaktion aufweisen.

In den mit KARNOVSKY-Lösung fixierten Paraffinschnitten erkennen die monoklonalen Antikörper MUC 8-22 und 2-63 keinerlei tumorassozierte Antigenstrukturen. Bei den mit Methanol/Aceton fixierten Schnittpräparaten zeigen einzelne Tumorzellen eine positive Reaktion.

(2) Glioblastom (N28/87)

Durch die monoklonalen Antikörper MUC 2-63 und 8-22 können in den nativen und Aceton-fixierten Gefrierschnitten an einigen Zellen tumorassoziierte Antigenstrukturen markiert werden.

(3) Astrozytom (N31/87)

Durch die monoklonalen Antikörper MUC 2-63 und 8-22 können in den untersuchten Gefrierschnitten an zahlreichen Zellen membranassoziierte bzw. intrazytoplasmatische Antigenstrukturen nachgewiesen werden.

2.7.2.2 Zellkulturen

Der Nachweis gliomassoziiierter Antigene erfolgte mit Hilfe der indirekten Immunperoxidasefärbung und der Immunfluoreszenz. Die erzielten Ergebnisse sind in der Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6: Bindungsverhalten monoklonaler Antikörper an Gliomzellen

Anti- körper	86HG-39		87HG-28		87HG-31	
	n	M/A	n	M/A	n	M/A
MUC 8-22	-	+	+	+	-	+
MUC 2-63	+	+	+	+	+	+
MUC 2-39	+	+	+	+	-	-
MUC 7-39	+	+	+	+	-	-

n : native Zellen

M/A: Methanol/Aceton fixiert

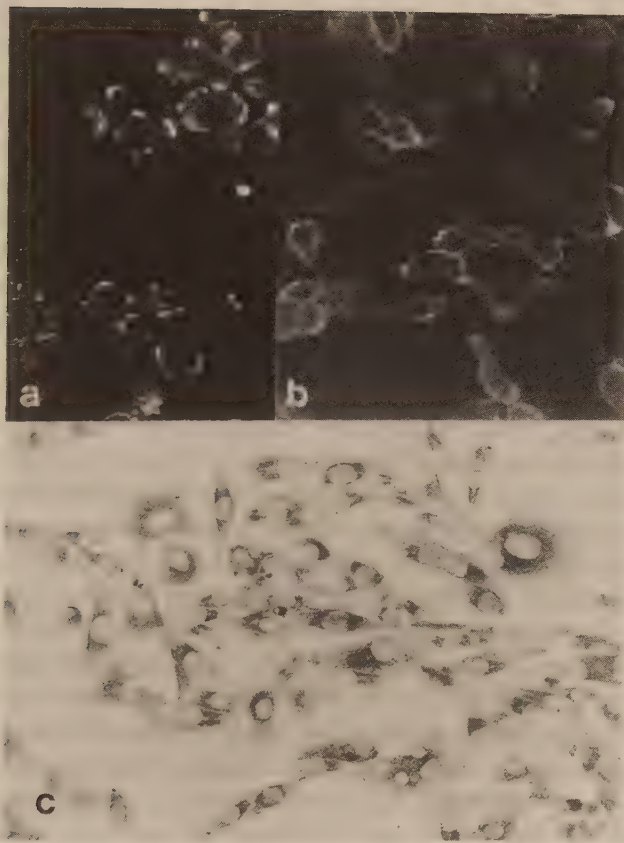


Abb. 6: Unterschiedliches Bindungsverhalten der monoklonalen Antikörper MUC 2-63 (a,b) und MUC 8-22 (c) an Zellen der Linie 86HG-39.

Membranfluoreszenz nach Anwendung von MUC 2-63 an nativen (a) und Methanol/Aceton fixierten (b) Zellen.

Intrazytoplasmatische Peroxidasefärbung nach Anwendung von MUC 8-22 an Methanol/Aceton fixierten Zellen (c).

a,b: Immunofluoreszenz x189

c : Immunperoxidasefärbung x189

E. DISKUSSION

Die in dieser Arbeit charakterisierten Zelllinien wurden aus 2 malignen Astrozytomen und einem Glioblastom etabliert. In früheren Veröffentlichungen wurden Vergleiche zwischen normalen und neoplastischen Gliazellen des Menschen in Zellkultur angestellt. Diese Untersuchungen führten zu der Erkenntnis, daß ein Zusammenhang zwischen der Malignität von Hirntumoren und ihrer Fähigkeit sich in vitro etablieren zu lassen besteht (PONTEN und MACINTYRE, 1968, WESTERMARK et al., 1973). Diese Annahme wird durch die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigt.

Eine Klassifizierung der Zelllinien nach morphologischen Gesichtspunkten wurde anhand der von BIGNER et al. (1981a) festgesetzten Kriterien vorgenommen. Nicht alle Zellen in einer Kultur entsprechen jedoch dem jeweils festgesetzten Wachstumsmuster. So sind z. B. in der als fibroblastoid eingeordneten Zelllinie 86HG-39 auch Zellen zu finden, die eher dem epithelialen Typ entsprechen. Auch in den beiden anderen, als fibroblastoid und fascikulär eingeordneten Gliomzelllinien 87HG-31 und 87HG-28, sind nicht nur Zellen eines Typs zu finden. Jedoch entspricht der überwiegende Anteil an der Zellpopulation den geforderten Charakteristika und rechtfertigt somit die jeweilige Klassifizierung.

Die in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen erfaßte Oberflächenstruktur der Zellen mit Blasen, Falten und Mikrovilli zeigt Unterschiede zu normalen Gliazellen, die eine weichere Oberfläche besitzen und bei denen die vorhandenen Oberflächenprojektionen gleich-

mäßiger angeordnet sind (MANUELIDIS und MANUELIDIS, 1979).

Eine Änderung in der Morphe maligner Gliomzellen in Richtung ihrer gutartigen Gegenstücke kann durch exogene Zuführung von db-cAMP und dadurch bedingte Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels erreicht werden (MACINTYRE et al., 1972). Dies beruht auf einer Kontrollfunktion, die die Adenylcyclase über die Differenzierungsvorgänge in der Zelle ausübt. Von den hier behandelten Zelllinien reagierten 86HG-39 und 87HG-31 in der erwarteten Weise mit der Ausbildung zusätzlicher, der Verlängerung und Verbreiterung bereits vorhandener Zellfortsätze, und einer deutlichen Wachstumsdepression der Zellkultur. Die rasterelektronenmikroskopischen Befunde stimmen mit den lichtmikroskopischen überein, jedoch konnte keine Änderung der Oberflächenstruktur zu dem glatteren Charakter normaler Zellen beobachtet werden. Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von MANUELIDIS und MANUELIDIS (1979).

Die Zelllinie 87HG-28 zeigte keinerlei Reaktion auf die Behandlung mit db-cAMP. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der morphologischen Klassifizierung als fascikulär und der fehlenden Reaktion auf db-cAMP wurde schon von anderen Autoren diskutiert (BIGNER et al., 1981a; BULLARD et al., 1981).

Die bisher festgestellte Heterogenität zwischen den aus Gliomen des Menschen etablierten Zelllinien und auch innerhalb dieser Zelllinien wurde durch die unterschiedli-

chen Werte, die für die Parameter "plating efficiency" und Generationszeit ermittelt wurden, bestätigt.

Ein weiteres Anzeichen für das unterschiedliche biologische Verhalten von Gliomzelllinien besteht in der variablen Angehrate nach der Transplantation in Nacktmäuse. Von den im Rahmen dieser Arbeit transplantierten Tumorzelllinien konnte nur in einem Fall, bei 86HG-39 ein Tumorwachstum beobachtet werden, hier jedoch bei 100 % der behandelten Tiere. Eine histologische Untersuchung des als N 39/86-T1 bezeichneten explantierten Tumors erbrachte die Bestätigung seiner Identität mit dem Ursprungstumor. Durch serienmäßige Transplantation der aus den Transplantationstumoren etablierten Zelllinien wurde die Tumorigenität bewiesen. Der Zeitraum von der Inokulation der Zellen bis zum Sichtbarwerden eines Tumors verkürzte sich im Laufe der in vivo Passagen. Die gleiche Steigerung in der Wachstumsgeschwindigkeit konnte auch bei den aus den Transplantationstumoren etablierten Zelllinien festgestellt werden. Diese Verkürzung der Passagezeiten in vivo und in vitro wurde von anderen Untersuchern bestätigt (BULLARD et al., 1981; MANDYBUR et al., 1986). BULLARD et al. (1981) führen als Erklärung an, entweder eine positive Selektion der zu schnellerem Wachstum befähigten Zellen innerhalb eines heterogenen Tumors oder eine allgemeine Adaptation an die Wachstumsbedingungen.

Die Transplantierbarkeit von Tumorzellen in Nacktmäuse gilt als ein Hinweis auf das maligne Potential dieser Zellen, eine Abstoßung des Transplantates ist jedoch kein Beweis für den nicht-neoplastischen Charakter der Zellen (MANOURY, 1977; RUTKA et al., 1987). Eine

Erklärung für die Transplantatabstoßung kann in den der Nacktmaus durch die Wirkung der NK-Zellen verbliebenen zellvermittelten, zytotoxischen Abwehrmechanismen vermutet werden (FORTMEYER, 1981). Andere Autoren fanden eine Abhängigkeit von der Menge der inokulierten Zellen, bzw. stellten eine höhere Erfolgsquote nach wiederholten Transplantationen fest (BULLARD et al., 1981). Eine weit höhere Angehrate konnte durch die direkte Transplantation von Tumorgewebe erreicht werden. BIGNER et al. (1981b) berichten über ein Tumorstadium bei 100 % der mit dieser Methode transplantierten Biopsieproben humaner Gliome, im Gegensatz zu nur 24 % bei anderen Tumoren. Bei der Transplantation von Zellen aus in vitro etablierten unterschiedlichen Neoplasien, konnte jedoch mit 61 % Tumorstadium ein größerer Erfolg als bei den aus Gliomen etablierten Zelllinien, von denen nur 16 % tumorigen in Nacktmäusen waren, erreicht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zelllinien 87HG-28 und 87HG-31 wiederholt transplantiert. Das gewünschte Ergebnis, d. h. die Erzeugung von Transplantations-tumoren konnte auch durch die immunsuppressive Behandlung der Nacktmäuse nicht erzielt werden.

Ein Zusammenhang zwischen der Transplantierbarkeit und anderen Charakteristika der Tumorzellen, wie "plating efficiency", Generationszeit und Morphologie konnte nicht in bemerkenswertem Maße erbracht werden, was durch frühere Untersuchungen bestätigt wird (BIGNER et al., 1981b).

Im Zuge ihrer Etablierung erfahren aus Gliomen des Menschen etablierte Zelllinien Änderungen ihres Chromosomensatzes. Die Karyotypisierung der Astrozytomlinie 86HG-39 in der 27. in vitro Passage ergab das Vorhandensein einer Stammlinie im hypodiploiden bzw. diploiden Bereich, mit der Tendenz zur Ausbildung von Seitenlinien in der hypotetraploiden/tetraploiden Region. Diese Verdoppelung des Chromosomensatzes vor Erreichen einer gewissen Anzahl von Passagen ist ein entscheidender Schritt im Hinblick auf die Entwicklung zu einer permanenten Zelllinie und für das Überleben in der Langzeitkultur unbedingt notwendig (BIGNER et al., 1987).

Bei der Zelllinie 86HG-39 findet sich ein Markerchromosom 9p+ und es liegt in den meisten Mitosen eine Nullisomie für die Chromosomen D13 vor. Die Zelllinien 86HG-39T1 und T2 wurden bis jetzt noch nicht karyotypisiert, was jedoch hinsichtlich der Bestätigung ihres humanen Ursprunges von beträchtlichem Interesse wäre.

Die Untersuchung der Gliomzelllinie 87HG-31 ergab in der 24. in vitro Passage einen Chromosomensatz im hypertriploiden Bereich, was sich in der 64. Passage bestätigte. Die für eine erfolgreiche Etablierung erforderliche Verdoppelung des Chromosomensatzes und das Einpendeln in die hypotetraploide bis hypertriploide Region haben hier bereits stattgefunden, so daß diese Zelllinie in der 24. in vitro Passage als etabliert bezeichnet werden konnte.

Bei 87HG-28 handelt es sich um eine Gliomzelllinie mit einer Stammlinie im hypodiploiden Bereich mit hypotetraploiden bis hypotriploiden Seitenlinien. Die Anzahl der in den einzelnen Chromosomengruppen vertretenen Mitosen zeigt an, daß bei dieser Zelllinie nach der Etablierung in vitro eine Entwicklung vom nahe diploiden zum triploiden Chromosomensatz über eine tetraploide Zwischenstufe stattfand. Dieses Phänomen wird bei Gliomzelllinien im Zuge ihrer Etablierung häufig beschrieben (REY et al., 1983).

Die Ergebnisse der an den Zelllinien durchgeführten immunologischen Untersuchungen stimmen mit denen der Primärtumoren überein. Ein positiver Nachweis des S-100 Proteins gelang bei einer unterschiedlich hohen Anzahl von Zellen aus den Gliomzelllinien 86HG-39 und 87HG-31, während bei 87HG-28 keine Zellen, die das Protein exprimierten nachzuweisen waren. Der höchste Anteil an S-100-positiven Zellen befand sich in der Zelllinie 87HG-31, etabliert aus einem Astrozytom WHO-Grad III. Eine Erklärung hierfür kann in dem höheren Differenzierungsgrad der Zellen dieses Tumors gefunden werden. Im Gegensatz dazu ist der Grad der Entdifferenzierung der Zellen in einem als Glioblastom eingeordneten Tumor, wie z. B. N 28/87, wesentlich weiter fortgeschritten. Dadurch erklärt sich auch das Fehlen S-100-positiver Zellen in der aus diesem Tumor etablierten Zelllinie. Dieser Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad von Gliomzellen und ihrer Fähigkeit das S-100 Protein zu exprimieren wurde schon von anderen Autoren diskutiert (HAGLID et al., 1973a, 1973b; DITTMANN et al., 1977).

Als ein zuverlässigerer Marker für den glialen Charakter von Zellen wird das saure Gliafaserprotein (GFAP) angesehen. In den hier vorliegenden Untersuchungen können sowohl in den Primärtumoren als auch in den daraus etablierten Zelllinien GFAP-positive Zellen nachgewiesen werden. Ähnlich wie für das S-100 Protein gilt auch hier ein Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad und der Fähigkeit der Zellen GFAP zu exprimieren. Dadurch erklärt sich der geringe Anteil an positiven Zellen, sowohl im Primärtumor N 28/87, als auch in der daraus etablierten Zelllinie 87HG-28.

Es gilt als gesichert, daß Hirntumorzellen an ihrer Oberfläche tumorassoziierte Antigene exprimieren. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper MUC 8-22, MUC 2-63 und MUC 7-39 wurden an den 3 Gliomzelllinien 86HG-39, 87HG-28 und 87HG-31 ebenso wie an den Primärtumoren gliomassoziierte Antigene nachgewiesen. Das unterschiedliche Bindungsverhalten der monoklonalen Antikörper an die Tumorzellen, sowie die Tatsache, daß innerhalb einer Zelllinie nicht alle Zellen gleichmäßig reagierten, konnte als ein weiteres Beispiel für die Heterogenität von Hirntumoren gewertet werden.

Gliome des Menschen zählen zu den sehr schwer therapiebaren Krebserkrankungen. Ein Grund hierfür ist sicherlich in der Heterogenität dieser Hirntumoren und der dadurch erschwerten Diagnostik zu suchen. Für ein besseres Verständnis der Zusammensetzung ihrer Zellpopulation und deren biologischem Verhalten sind Untersuchungen an aus diesen Tumoren etablierten Zelllinien von großer Bedeutung. Es besteht die Möglichkeit aus solchen Untersuchungen neue Erkenntnisse zur Ent-

wicklung diagnostischer und möglicherweise therapeutischer Methoden zu gewinnen.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Drei maligne Gliome des Menschen, zwei Astrozytome WHO-Grad III und ein Glioblastom, wurden in vitro kultiviert und mit Hilfe der Trypsinierungstechnik als permanente Zelllinien etabliert. Eine Charakterisierung der Zelllinien erfolgte durch Untersuchung von Struktur und verschiedener biologischer und immunchemischer Parameter. Vergleichende morphologische Betrachtungen wurden anhand lichtmikroskopischer und rasterelektronenmikroskopischer Untersuchungen durchgeführt. Auf die Behandlung mit db-cAMP reagierten die Zelllinien 86HG-39 und 87HG-31 mit der Ausbildung von Fortsätzen und einer Wachstumsdepression, während bei 87HG-28 kein Effekt zu beobachten war.

Die Zellen der etablierten Zelllinien wurden thymusaplastischen Nacktmäusen subkutan inokuliert. Nur in einem Fall (86HG-39) führte die Transplantation von Tumorzellen zum Wachstum eines Tumors an der Inokulationsstelle. Dieser Transplantationstumor wurde histologisch untersucht bzw. explantiert, als Zelllinie etabliert und erneut transplantiert.

Das Wachstumsverhalten der Zelllinien wurde anhand der Parameter "plating efficiency" und Generationszeit untersucht, wobei sich ausgesprochen variable Werte ergaben. Die Chromosomenanalysen ergaben eine signifikante Aneuploidie für alle drei Zelllinien. Eine Karyotypisierung wurde nur bei 86HG-39 durchgeführt und dabei ein Markerchromosom 9p+ gefunden.

Mit Hilfe der indirekten Immunperoxidasefärbung und der Immunfluoreszenz erfolgte der Nachweis des S-100- bzw. GFA-Proteins. Während die Zelllinie 87HG-28 sich beim Nachweis des S-100 Proteins negativ verhielt, konnte in den beiden anderen Fällen eine spezifische Fluoreszenz bzw. Peroxidasefärbung beobachtet werden. Der Nachweis von GFAP gelang in unterschiedlichem Ausmaß in den Zellen aller drei Zelllinien.

Unter der Verwendung monoklonaler Antikörper, wurde die Expression gliomassoziierter Antigene dargestellt. Die Zelllinie 86HG-39 zeigte mit dem Antikörper MUC 8-22 auf nativen Zellen keine Reaktion, während auf Methanol/Aceton fixierten Zellen intrazelluläre Strukturen erkannt wurden. Mit den Antikörpern MUC 2-63 und MUC 7-39 war sowohl auf nativen als auch auf fixierten Zellen eine positive Reaktion zu beobachten. Die Zelllinie 87HG-28 wurde von allen verwendeten Antikörpern auf nativen und fixierten Präparaten erkannt. Mit den Antikörpern MUC 8-22 und MUC 2-63 zeigte die Zelllinie 87HG-31 das gleiche Bindungsverhalten wie die 86HG-39 Zelllinie, während mit MUC 7-39 weder an nativen noch an fixierten Zellen eine Bindung zu beobachten war.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die in vitro etablierten und partiell charakterisierten Zelllinien trotz der phänotypischen Heterogenität für weitere immunologische Untersuchungen geeignet sind.

SUMMARY

ESTABLISHMENT AND CHARACTERISATION OF GLIOMA DERIVED CELL LINES

Three human malignant gliomas, two WHO-grade III astrocytomas and a glioblastoma were cultivated in vitro and established as permanent cell lines by means of the trypsinisation method. Characterisation of the cell lines was effected by the examination of the structure and various biological and immunochemical parameters. Comparative morphological considerations were carried through on the basis of light microscopic and scanning-electron microscopic examinations. Cell lines 86HG-39 and 87HG-31 reacted to treatment with db-cAMP by developing processes and growth suppression, whereas no effect was watched with 87HG-28.

The cells of the established cell lines were inoculated subcutaneously to thymus-aplastic nude mice. It was only in one case (86HG-39) that transplantation of tumour cells led to the growth of a tumour at the site of inoculation. This tumour was histological examined and explanted, established as cell line and retransplanted.

The growth behaviour of the cell lines was examined on the basis of the parameters plating efficiency and generation time, with markedly variable values resulting. Chromosome analyses revealed a significant aneuploidy for all three cell lines. Karyotypisation was only carried through in 86HG-39 and a marker chromosome 9p+ was found.

The S-100 and GFA proteins were identified by means of indirect immunoperoxidase staining and immunofluorescence. Whereas cell line 87HG-28 was negative in identifying the S-100 protein, a specific fluorescence or peroxidase staining became evident in the two other cases. Identification of GFAP was successful to different extents in the cells of all three cell lines.

Using monoclonal antibodies, the expression of glioma-associated antigens was demonstrated. Cell line 86HG-39 did not show any reaction with the antibody MUC 8-22 on native cells, whereas intracellular structures were recognised on methanol/acetone-fixed cells. With antibodies MUC 2-63 and MUC 7-39 a positive reaction was recognised on native as well as fixed cells. The cell line 87HG-28 was recognised by all antibodies used on native and fixed specimens. With antibodies MUC 8-22 and MUC 2-63, the cell line 87HG-31 showed the same binding behaviour as the 86HG-39 cell line, whereas no binding was observed with MUC 7-39, neither in native nor in fixed cells.

To summarise, we can say that the cell lines established in vitro and partially characterised are suitable for further immunological examination despite phenotypical heterogeneity.

G. LITERATURVERZEICHNIS

- ANZIL, A.P., STAVROU, D., RIESKE, E.: Effects of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on rabbit glioma cells .
In: P. PAOLETTI, M.D. WALKER, G. BUTTI, R. KNE-RICH (eds) Multidisciplinary aspects of brain tumor therapy, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam 1979, pp 323-328
- de ARMOND, S.J., ENG, L.F., RUBINSTEIN, L.J.: The application of glial fibrillary acidic (GFA) protein immunohistochemistry in neuro-oncology. A progress report.
Pathol. Res. Pract. 168, 374-394 (1980)
- BENDA, P.: Protein S-100 et tumeurs cerebrales humaines.
Rev. Neurol. 118, 368-372 (1968)
- BIGNAMI, A., DAHL, D.: Specificity of the glial fibrillary acidic protein for astroglia.
J. Histochem. Cytochem. 25, 466-469 (1977)
- BIGNER, D.D.: The biology of gliomas: potential clinical implications of glioma cellular heterogeneity.
J. Neurosurg. 9, 320-326 (1981)

BIGNER, D.D., BIGNER, S.H., PONTEN, J., WESTERMARK, B., MAHALEY, M.S., RUOSLAHTI, E., HERSCHMAN, H., ENG, L.F., WIKSTRAND, C.J.: Heterogeneity of genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas.

J. Neuropathol. Exp. Neurol. 40, 201-229
(1981a)

BIGNER, S.H., BULLARD, E.E., PEGRAM, C.N., WIKSTRAND, C.J., BIGNER, D.D.: Relationship of in vitro morphologic and growth characteristics of established human glioma-derived cell lines to their tumorigenicity in athymic mice.

J. Neurophathol. Exp. Neurol. 40, 390-409
(1981b)

BIGNER, S.H., MARK, J.: Chromosomes and chromosomal progression of human gliomas in vivo, in vitro and in athymic nude mice.

Proq. Exp. Tumor Res. 27, 67-82 (1984)

BIGNER, S.H., MARK, J., MAHALEY, M.S., BIGNER, D.D.: Patterns of the early, gross chromosomal changes in malignant human gliomas.

Hereditas 101, 103-113 (1984)

BIGNER, S.H., MARK, J., BIGNER, D.D.: Chromosomal progression of malignant human gliomas from biopsy to establishment as permanent lines in vitro.

Cancer Genet. Cytogenet. 24, 163-176 (1987)

- BONNIN, J.M., RUBINSTEIN, L.J.: Immunohistochemistry of central nervous system tumors.
J. Neurosurg. 60, 1121-1133 (1984)
- BRADLEY, N.J., BLOOM, H.J.G., DAVIES, A.J.S., SWIFT, S.M.: Growth of human gliomas in immune-deficient mice: A possible model for preclinical therapy studies.
Br. J. Cancer 38, 263-272 (1978)
- BUCKLEY, R.C.: Tissue culture studies of the glioblastoma multiforme.
Amer. J. Pathol. 5, 467-472 (1929)
- BULLARD, D.E., SCHOLD, S.C., BIGNER, S.H., BIGNER, D.D.: Growth and chemotherapeutic response in athymic mice of tumors arising from human glioma-derived cell lines.
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 40, 410-427 (1981)
- BULLARD, D.E., BIGNER, D.D.: Applications of monoclonal antibodies in the diagnosis and treatment of primary brain tumors.
J. Neurosurg. 63, 2-16 (1985)
- CARREL, S., de TRIBOLET, N., MACH, J.P.: Expression of neuro-ectodermal antigens common to melanomas, gliomas and neuroblastomas.
Acta Neuropathol. (Berl.) 57, 158-164 (1982)

- CHEN, T.T., MEALEY, J., Jr., CAMPBELL, R.L.: Quantitative cloning of malignant human glioma cells by conditioned medium.
J. Natl. Canc. Inst. **55**, 1275-1280 (1975)
- CICERO, T.J., COWAN, W.M., MOORE, B.W., SUNTZEFF, V.: The cellular localization of the two brain specific proteins S-100 and 14.3.2..
Brain Res. **18**, 25-34 (1970)
- COAKHAM, H.B.: Surface antigen(s) common to human astrocytoma cells.
Nature **250**, 328-330 (1974)
- COAKHAM, H.B., LAKSHIMI, M.S.: Tumor associated surface antigen(s) in human astrocytomas.
Oncology **31**, 233-243 (1975)
- COBB, L.M.: The hamster as a host for the growth of human tumor cell population.
Cancer Res. **34**, 958-963 (1974)
- COONS, A.H.: The application of fluorescent antibodies to the study of naturally occurring antibodies.
Ann. N.Y. Acad. Sci. **69**, 658-662 (1957)
- DAVIES, G., DUKE, D., GRANT, A.G., KELLY, S.A., HERMONTAYLOR, J.: Growth of human digestive-tumor xenografts in athymic nude rats.
Br. J. Cancer **43**, 53-58 (1981)

- DELPECH, B., DELPECH, A., VIDARD, M.N., GIRARD, N.,
TAYOT, J., CLEMENT, J.C., GREISSARD, P.: Glial
fibrillary acidic protein in tumors of the ner-
vous system.
Br. J. Cancer 37, 33-40 (1978)
- DITTMANN, L., AXELSEN, N.H., NRGAAARD-PEDERSEN, B.,
BOCH, E.: Antigens in human glioblastomas and
meningiomas: Search for tumor and onco-foetal
antigens. Estimation of S-100 and GFA protein.
Br. J. Cancer 35, 135-141 (1977)
- DOHAN, F.C., KORNBLITH, P.L., WELLUM, G.R., PFEIFFER,
S.E., LEVINE, L.: S-100 protein and 2',3'-cy-
clic nucleotide 3'- phosphohydrolase in human
brain tumors.
Acta Neuropathol. (Berl.) 40, 123-128 (1977)
- DRUCKREY, H., IVANCOVIC, S., PREUSSMANN, R.: Selektive
Erzeugung von Hirntumoren bei Ratten durch Me-
thylnitrosoharnstoff.
Naturwissenschaften 51, 144-146 (1964)
- DUFFY, P.E., GRAF, L., RAPPORT, M.M.: Identification of
glial fibrillary acidic protein by the immu-
noperoxidase method in human brain tumors.
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 36, 645-652 (1977)
- DUUFY, P.E.: Astrocytes: Normal, reactive, and neoplas-
tic.
Raven Press, New York 1983

- ENG, L.F., VANDERHAEGEN, I.J., BIGNAMI, A., GERSTL, B.:
An acidic protein isolated from fibrous
astrocytes.
Brain Res. 28, 351-354 (1971)
- ENG, L.F.: The glial fibrillary acidic protein: The major protein constituent of glial filaments.
Scand. J. Immunol. 15 Suppl. 9, 41-51 (1982)
- FEDEROFF, S.: Proposed usage of animal tissue culture terms.
J. Natl. Cancer Inst. 38, 607-610 (1967)
- FISCHER, A.: Observations on the division of sarcoma cells in vitro.
J. Cancer Res. 9, 71-84 (1925)
- FLANAGAN, S.P.: "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse.
Genet. Res. Camb. 8, 295 (1966)
- FORTMEYER, P.H.: Thymusaplastische Maus (nu/nu), thymusaplastische Ratte (rnu/rnu).
Schriftenreihe Versuchstierkunde, 8
Parey Verlag, Berlin-Hamburg 1981
- FRANKS, C.R., BOULGER, L.R., GARRETT, A.J.: Metastatic growth in human tumor xenografts in thymectomized irradiated mice reconstituted with syngenic bone marrow cells.
Eur. J. Cancer 11, 619-622 (1975)

FRANKS, C.R., BISHOP, D., REESON, D.: The growth of tumor xenografts in thymectomized high-dose irradiated mice reconstituted with syngeneic bone marrow cells incubated with antithymocyte serum.

Br. J. Cancer 33, 112-115 (1976)

FURMAN, M., SHULMAN, K.: Cyclic AMP and adenyl cyclase in brain tumors.

J. Neurosurg. 46, 477-483 (1977)

GIOVANELLA, B.C., STEHLIN, J.S.: Assessment of the malignant potential of cultured cells by injection in "nude" mice.

In: RYGAARD, J., POVLSEN, C.O. (eds)

Proc. 1st Int. Workshop on Nude Mice

G. Fischer Verlag, Stuttgart 1974, pp 279-284

GOLDMAN, J.E., SCHAUMBURG, H.H., NORTON, W.T.: Isolation and characterization of glial filaments from human brain.

J. Cell Biol. 78, 426-440 (1978)

GRANT, A.G., DUKE, D., HERMON-TAYLOR, J.: Establishment and characterization of primary human pancreatic carcinoma in continuous cell culture and in nude mice.

Br. J. Cancer 39, 143-151 (1979)

GREENE, H.S.N., ARNOLD, H.: The homologous and heterologous transplantation of brain and brain tumors.

J. Neurosurg. 2, 315-331 (1945)

- GREENE, H.S.N: The transplantation of tumors to the brain of heterologous species.
Cancer Res. 11, 529-534 (1951)
- GREENE, H.S.N: The transplantation of brain tumors to brains of laboratory animals.
Cancer Res. 13, 422-426 (1953)
- HAGLID, K., CARLSSON, C.-A.: An immunological study of some human brain tumors concerning the brain specific protein S-100.
Neurochirurgia (Stuttg.) 13, 19-28 (1971)
- HAGLID, K., CARLSSON, C.-A., STAVROU, D.: An immunological study of human brain tumors concerning the brain specific proteins S- 100 and 14.3.2.
Acta Neuropathol. (Berl.) 24, 187-196 (1973a)
- HAGLID, K., STAVROU, D., RÖNNBÄCK, L., CARLSSON, C.-A., WEIDENBACH, W.: The S-100 protein in water-soluble and pentanol-extractable form in normal human brain and tumors of the human nervous system. A quantitative study.
J. Neurol. Sci. 20, 103-111 (1973b)
- HARRISON, R.G.: Observations on the living developing nerve fiber.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 4, 140 (1907)

- HERBERMAN, R.B., NUNN, M.E., LAVRIN, D.H.: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. Int. J. Cancer 16, 216 (1975)
- HERBERMAN, R.B.: Immunogenicity of tumor antigens. Biochem. Biophys. Acta 473, 93-119 (1977)
- HERBERMAN, R.B.: Natural cell-mediated cytotoxicity in nude mice.
In: J. FOGH, B.C. GIOVANELLA (eds) The nude mouse in experimental and clinical research. Academic Press, New York - San Francisco - London 1978
- HERLYN, D., STEPLEWSKI, Z., HERLYN, M., KOPROWSKI, H.: Inhibition of growth of colorectal carcinoma in nude mice by monoclonal antibodies. Cancer Res. 40, 717-721 (1980)
- HOLDEN, H.T., HERBERMAN, R.B., SANTONI, A., NUNN, M.E.: Natural cell-mediated cytotoxicity in nude mice.
In: D.P. HOUCHEMS, A.A. OVEJERA (eds) Proc. Symp. on the Use of Athymic (nude) Mice in Cancer Research, G. Fischer Verlag, New York - Stuttgart 1978
- HYDEN, H., MCEWEN, B.: A glial protein specific for the nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash) 55, 354-358 (1966)

- JACQUE, C.M., KUJAS, M., POREAU, A., RAOUL, M., COLLIER, P., RACADOT, J., BAUMANN, N.: GFA and S-100 Protein levels as an index for malignancy in human gliomas and neurinomas.
J. Natl. Cancer Inst. 62, 479-483 (1979)
- JOHNSON, G.S., PASTAN, J.: Role of 3'5-adenosine monophosphate in regulation of morphology and growth of transformed and normal fibroblasts.
J. Natl. Cancer Inst. 48, 1347-1387 (1972)
- JONES, T.R., BIGNER, S.H. SCHOULD, S.C., Jr., ENG, L.F., BIGNER, D.D.: Anaplastic human gliomas grown in athymic mice.
Amer. J. Pathol. 105, 316-327 (1981)
- JOST, J.-P., RICKENBERG, H.V.: Cyclic AMP.
A. Rev. Biochem. 40, 741-774 (1971)
- KAMEYA, T., SHIMOSATO, Y., HAYASHI, H., TSUMURAYA, M.: Growth and differentiation of hormone-producing human tumors in nude mice.
In: T. NOMURA, N. OKSAWA, N. TAMAOKI, K. FUJIWARA (eds) Proceedings of the Second International Workshop on Nude Mice. G. Fischer Verlag, New-York - Stuttgart 1976, pp 405-416
- KENNETT, R.H., GILBERT, F.: Hybrid myelomas producing antibodies against a human neuroblastoma antigen present on fetal brain.
Science 203, 1120-1121 (1979)

KENNETT, R.H., JONAK, Z.L., BECHTOL, K.B.: Monoclonal antibodies against human tumor-associated antigens.

In: R.H. KENNETT, T.J. McKEARN, K.B. BECHTOL (eds) Monoclonal antibodies. Plenum Press, New York 1980, pp 155-168

KERSTING, G.: Die Gewebszüchtung menschlicher Hirngeschwülste.

Springer-Verlag, Heidelberg 1961

KÖHLER, G., MILSTEIN, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.

Nature 256, 495-497 (1975)

KORNBLITH, P.L., DOHAN, F.C., WOOD, W.C., WHITEMAN, B.O.: Human astrocytoma: Serum mediated immunologic response.

Cancer 33, 1512-1519 (1974)

KREDEL, F.E.: Tissue culture of intracranial tumours.

Amer. J. Pathol. 4, 337-340 (1928)

LISS, L.: The use of tissue cultures in the study of brain tumors.

Progr. Exp. Tumor Res. 17, 93-110 (1972)

LOOR, F., ROELANTS, G.E.: High frequency of T lineage lymphocytes in nude mouse spleen.

Nature 251, 229 (1974)

LOOR, F., ROELANTS, G.E.: Immunofluorescence studies of a possible prethymic T-cell differentiation in congenitally athymic (nude) mice.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 254, 226 (1975)

LUMSDEN, C.E.: The study by tissue culture of tumours of the nervous system.

In: D.S. RUSSEL, L.J. RUBINSTEIN (eds) Pathology of tumors of the nervous system, 3. Auflage, Arnold, London 1971, pp 334-420

MACINTYRE, E.H., WINTERSGILL, C.J., PERKINS, J.P., VATTER, A.E.: The response in culture of human tumor astrocytes and neuroblasts to N⁶, O²-dibutyryl adenosine 3',5-monophosphoric acid.

J. Cell Sci. 11, 639-667 (1972)

MANDYBUR, T.J., SAWAYA, R., ORMSBY, J.: The morphology and biologic behavior of human glioblastoma growing in nude mice.

Cancer 58, 1061-1069 (1986)

MANOURY, R.: Establishment and characterization of 5 human cell lines derived from a series of 50 primary intracranial tumors.

Acta Neuropathol. (Berl.) 39, 33-41 (1977)

MANUELIDIS, E.E., POND, A.R.: Continuous cultivation of cells arising from human case of glioblastoma multiforme (Glioma T.C.178).

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 102, 693-695 (1959)

MANUELIDIS, E.E.: Long-term lines of tissue cultures of intracranial tumors.

J. Neurosurg. 22, 368-373 (1965)

MANUELIDIS, E.E.: Experiments with tissue culture and heterologous transplantation of tumors.

Ann. N.Y. Acad. Sci 159, 409-431 (1969)

MANUELIDIS, L., MANUELIDIS, E.E.: Surface growth characteristics of defined normal and neoplastic neuroectodermal cells in vitro.

Prog. Neuropathol. 4, 235-266 (1979)

MARTIN, B.: Bindungseigenschaften monoklonaler Antikörper gegen Gliome des Menschen in vitro und in vivo.

Dissertation, Uni. München 1988

MOORE, B.W., MCGREGOR, D.: Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver.

J. Biol. Chem. 240, 1647-1653 (1965)

MOORE, B.W.: A soluble protein characteristic of the nervous system.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 739-744 (1965)

MOORE, B.W.: Chemistry and biology of the S-100 protein.

Scand. J. Immunol. 15, Suppl. 9, 53-74 (1982)

- MOSCONA, A.: Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos.
Exp. Cell Res. **3**, 535 (1952)
- NADLER, L.M., STASHENKO, P., HARDY, R., KAPLAN, W.D.,
BUTTON, L.N., KUTE, W., ANTMAN, K.H.,
SCHLOSSMAN, S.F.: Serotherapy of a patient with
monoclonal antibody directed against a human
lymphoma associated antigen.
Cancer Res. **40**, 3147-3154 (1980)
- NEXØ, B.A.: A plaque assay for murine leukemia virus
using enzyme-coupled antibodies.
Virology **77**, 849-852 (1977)
- PANTELOURIS, F.M.: Absence of thymus in a mouse mutant.
Nature **217**, 370-371 (1968)
- PAUL, J.: Zell- und Gewebekulturen
W. de Gruyter Verlag, New York - Berlin 1980
- PEREZ, V.J., MOORE, B.W.: Wallerian degeneration in
rabbit tibial nerve: Changes in amounts of the
S-100 protein.
J. Neurochem. **15**, 971-977 (1968)
- PEREZ, V.J., OLNEY, J.W., CICERO, T.J., MOORE, B.W.,
BAHN, B.A.: Wallerian degeneration in rabbit
optic nerve: Cellular localization in the cen-
tral nervous system of the S-100 and 14.3.2.
proteins.
J. Neurochem. **17**, 511-519 (1970)

- PFEIFFER, S.E., KORNBLITH, P.L., CARES, H.L., SEALS, J., LEVINE, L.: S-100 protein in human acoustic neurinomas.
Brain Res. 41, 187-193 (1972)
- PFREUNDSCHUH, M., SHIKU, H., TAKANASHI, T., UEDA, R., RANSOHOFF, J., OETTGEN, H.F., OLD, L.J.: Serological analysis of cell surface antigens of human malignant brain tumors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5122-5126 (1978)
- PONTEN, J., MACINTYRE, E.H.: Long-term culture of normal and neoplastic human glia.
Acta Pathol. 74, 465-486 (1968)
- PONTEN, J., WESTERMARK, B.: Properties of human malignant glioma cells in vitro.
Med. Biol. 56, 184-193 (1978)
- POVLSEN, C.O., FIALKOW, P.J., KLEIN, E., KLEIN, G., RYGAARD, J., WIENER, F.: Growth and antigenic properties of a biopsy-derived Burkitt's lymphoma in thymus-less (nude) mice.
Int. J. Cancer 11, 30-39 (1973)
- POVLSEN, C.O., VISFELDT, J., RYGAARD, J., JENSEN, G.: Growth patterns and chromosome constitutions of human malignant tumors after long term serial transplantation in nude mice.
Acta path. microbiol. Scand. Sect. A. 83, 709-716 (1975)

- RANA, M.W., PINKERTON, H., THORNTON, H., NAGY, D.: Heterotransplantation of human glioblastoma multiforme and meningioma to nude mice.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 155, 85-88 (1977)
- RANKIN, J.K., YUNG, W.K.A., SHAPIRO, W.R.: Chromosomal evolution of early passage cells derived from human gliomas.
Amer. J. Hum. Genet. 32, 85 A (1980)
- REY, J.A., BELLO, M.J., RAMOS, C., BENITEZ, J., MUELAS, J.M.: Serial cytogenetic study of a human glioma cell line.
Cancer Genet. Cytogenet. 8, 287-295 (1983)
- ROUS, P., JONES, F.S.: A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues and for the plating out of individual cells.
J. exp. Med. 23, 549 (1916)
- RUSSEL, D.S., BLAND, J.O.W.: A study of gliomas by the method of tissue culture.
J. Path. Bact. 36, 273-283 (1933)
- RUTKA, J.T., GIBLIN, J.R., DOUGHERTY, D.Y., LIU, H.C., McCULLOCH, J.R., BELL, C.W., STERN, R.S., WILSON, S.B., ROSENBLUM, M.L.: Establishment and characterization of five cell lines derived from human malignant gliomas.
Acta Neuropathol. (Berl.) 75, 92-103 (1987)

- RYGAARD, J.: Immunbiology of the mouse mutant "nude".
Preliminary investigations.
Acta path. microbiol. Scand. 77, 761 (1969)
- RYGAARD, J., POVLSEN, C.O.: Heterotransplantation of a
human malignant tumor to "nude" mice.
Acta path. microbiol. Scand. 77, 758-760 (1969)
- SATO, V.L., WAKSAL, S.D., HERZENBERG, L.A.: Identification
and separation of pre T-cells from nu/nu
mice. Differentiation by preculture with thymic
reticuloepithelial cells.
Cell Immunol. 24, 173 (1976)
- SCHNEGG, F.J., de TRIBOLET, N., DISERENS, A.C., MARTIN-
ACHARD, A., CARREL, S.: Characterization of a
rabbit anti-human malignant glioma antiserum.
Int. J. Cancer 28, 265-269 (1981a)
- SCHNEGG, J.F., DISERENS, A.C., CARREL, S., ACCOLLA,
R.S., de TRIBOLET, N.: Human glioma-associated
antigens by monoclonal antibodies.
Cancer Res. 41, 1209-1213 (1981b)
- SEEGER, R.S., ROSENBLATT, H.M., IMAI, K., FERRONE, S.:
Common antigenic determinants of human mela-
noma, glioma, neuroblastoma, and sarcoma cells
defined with monoclonal antibodies.
Cancer Res. 41, 2714-2717 (1981)

- SHAPIRO, W.R., BASLER, G.A., CHERNIK, N.L., POSNER, J.B.: Human brain tumor transplantation into nude mice.
J. Natl. Cancer Inst. 62, 447-453 (1979)
- SHAPIRO, J.R., YUNG, W.K.A., SHAPIRO, W.R.: Isolation, karyotype and clonal growth of heterogeneous subpopulations of human malignant gliomas.
Cancer Res. 41, 2349-2359 (1981)
- STAVROU, D.: Beitrag zur Morphologie und Enzymhistochemie experimenteller Tumoren des Zentralnervensystems der Ratte. I. Morphologische Befunde:
Acta Neuropathol. (Berl.) 15, 220-230 (1970)
- STAVROU, D.: Zur vergleichenden Pathologie der Tumoren des Nervensystems.
Zbl. Vet. Med. A 18, 585-645 (1971)
- STAVROU, D., HAGLID, K.G.: Morphologie und immunologische Untersuchungen zur Histogenese experimenteller Hirntumoren.
J. neurol. Sci. 20, 39 (1973)
- STAVROU, D., HAGLID, K.G., DANNER, K., WEIDENBACH, W.: Cytologischer Nachweis des gliaspezifischen S-100-Proteins bei neurogenen Tumoren.
Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 57, 408 (1973)
- STAVROU, D., ELLING, H., OSTERKAMP.: Zytotoxische Antikörper gegen experimentelle Gliome.
Zbl. Allg. Path. 121, 568 (1977)

- STAVROU, D., ANZIL, A.P., ELLING, H.: Tumor specific fluorescent and complement-dependent cytotoxic antibodies in the serum of rats with chemically induced brain gliomas.
Acta Neuropathol. (Berl.) 43, 111-117 (1978)
- STAVROU, D., OSTERKAMP, U. SCHRÖDER, B., ANZIL, A.P., ZANKER, K.: Selected morphological, immunocytochemical and growth characteristics of three experimental rat gliomas and of their cells in vitro.
Exp. Cell Biol. 47, 3-21 (1979)
- STAVROU, D., KEIDITSCH, E., SCHMIDBERGER, F., BISE, K., FUNKE, I., EISENMENGER, W., KURRLE, R., MARTIN, B., STOCKER, U.: Monoclonal antibodies against human astrocytomas and their reactivity pattern.
J. Neurol. Sci. 80, 205-220 (1987)
- STEINBACH, J.H., SCHUBERT, D.: Multiple modes of dibutyryl cyclic AMP-induced process formation by clonal nerve and glial cells.
Exp. Cell Res. 91, 449-453 (1975)
- THOMAS, C., KERSTING, G.: Zur Morphologie der durch Methylnitrosoharnstoff erzeugten Hirntumoren bei der Rate.
Naturwissenschaften 51, 144-145 (1964)
- TROUILLAS, P.: Carcinofoetal antigen in rat glial tumors.
Lancet 2, 552 (1971)

VISFELDT, J., POVLSEN, C.O. RYGAARD, J.: Chromosome analysis of tumor following heterotransplantation to the mouse mutant nude.

Acta path. microbiol. Scand. 80, 169-176 (1972)

WAHLSTROM, T., SAKSELA, E., TROUPP, H.: Cell bound antigitlial immunity in patients with malignant tumors of the brain.

Cell Immunol. 6, 161-170 (1973)

WESTERMARK, B., PONTEN, J., HUGOSSON, R.: Determinants for the establishment of permanent tissue culture lines from human gliomas.

Acta path. microbiol. Scand. (A) 81, 791-805 (1973)

WIKSTRAND, C.J., MAHALEY, M.S., BIGNER, D.D.: Surface antigens characteristic of human glial brain tumor cells.

Cancer Res. 37, 4267-4275 (1977)

WIKSTRAND, C.J., BIGNER, D.D.: Surface antigens of human glioma cells shared with normal and fetal brain.

Cancer Res. 39, 3235-3243 (1979)

WIKSTAND, C.J., BIGNER, D.D.: Expression of human fetal brain antigens by human tumors of neuroectodermal origin as defined by monoclonal antibodies.

Cancer Res. 42, 267-275 (1982)

WÖHLER, B.: Chromosomenmuster von in vitro etablierten
Gliomzelllinien.

Dissertation, Uni. München 1988

Bei allen, die mir auf vielfältige Weise bei der Erstellung dieser Arbeit zur Seite standen, möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.Dr.D.Stavrou für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung.

Bei der Durchführung der Experimente war Frau D. Wallmann eine unschätzbare Hilfe.

Für ihre technische Hilfsleistung bedanke ich mich bei Frau A. Lechner.

Schließlich möchte ich mich bei Frau Dr. B. Wöhler sowie bei Frau I. Eberl für die freundliche Hilfestellung bedanken.

Lebenslauf

- 1960 geboren am 17. Februar in Memmingen
Vater: August Kutter, Kaufmann
Mutter: Margarete Kutter, geb. Kluger
- 1966-1977 Besuch der Volksschule in Memmingen
- 1970-1974 Besuch des Gymnasiums in Memmingen
- 1974-1976 Besuch des Gymnasiums in Kempfenhausen
- 1976-1978 Besuch des Gymnasiums in Memmingen
- 1978-1980 Besuch des Gymnasiums in Neubeuern am Inn
- 1980 27. Juni Abitur
- 1981 Mai-Juli Studium der Betriebswirtschaftslehre an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1981-1982 November-Mai Studium der Pharmazie an der Universität Düsseldorf
- 1982-1984 Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover
- 1984-1987 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1987 29. Oktober Staatsexamen
16. November Beginn der Dissertation am Institut für Tierpathologie, Abteilung Funktionelle Pathologie (Prof.Dr.Dr.med. D.Stavrou) der Ludwig-Maximilians-Universität München

